

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14536 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MARKL, Jürgen
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08129 (DE/DE); An der Mahlsteig 12, D-55296 Gau-Bischofsheim (DE). ALTENHEIN, Benjamin (DE/DE); Elsässer Platz 7, D-65195 Wiesbaden (DE). LIEB, Bernhard (DE/DE); Konrad-Adenauer-Str. 27, D-55129 Mainz (DE). STIEFEL, Thomas (DE/DE); Steinkopfst. 22, D-70184 Stuttgart (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. August 2000 (21.08.2000)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: 199 39 578 0/ 20. August 1999 (20.08.1999) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH (DE/DE); Schornborfer Str. 32, D-70734 Fellbach (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE COMPRISING A NUCLEIC ACID SEQUENCE WHICH CODES FOR A HAEMOCYANIN, AND COMPRISING AT LEAST ONE INTRON SEQUENCE

(54) Bezeichnung: NUKLEINSÄUREMOLEKÜL, UMFASSEND EINE FÜR EIN HÄMOCYANIN KODIERENDE NUKLEIN-SÄURESEQUENZ UND MINDESTENS EINE INTRONSEQUENZ

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid molecule which comprises a nucleic acid sequence that codes for a haemocyanin, a haemocyanin domain or a fragment with the immunological properties of at least one domain of haemocyanin, and which comprises at least one intron sequence. The invention also relates to constructs which contain the nucleic acid molecule and which, optionally, contain a promoter suited for controlling expression. In a preferred embodiment, the construct also contains a nucleic acid sequence which codes for an antigen. The invention also relates to host cells containing these nucleic acid molecules and/or constructs, to the recombinant expression of the nucleic acid molecules and/or constructs in the host cells, to haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment with the immunological properties of at least one domain of haemocyanin, and to haemocyanin fusion proteins that are coded by the nucleic acid molecules and/or by the constructs. The invention additionally relates to pharmaceutical compositions which contain the nucleic acid molecules and/or haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, and to liposomes containing the nucleic acid molecules and/or haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein. Finally, the invention also relates to antibodies which can be obtained by immunizing an experimental animal with the haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, and to the use thereof in screening methods for identifying tumors.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz und mindestens eine Intronsequenz. Weiterhin betrifft die Erfindung Konstrukte, die das Nukleinsäuremolekül und gegebenenfalls einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Konstrukt ferner eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz. Die Erfindung betrifft ausserdem Wirtszellen, die diese Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die rekombinante Expression der Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte in den Wirtszellen. Weiterhin betrifft die Erfindung Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin und Hämocyanin-Fusionsproteine, die von den Nukleinsäuremolekülen und/oder Konstrukten kodiert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung Liposomen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem Hämocyanin, einer Hämocyanin-Domäne, einem Fragment davon oder einem Fusionsprotein, erhältlich sind, und deren Verwendung in Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumoren.

WO 01/14536 A2



MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz und mindestens eine Intronsequenz

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz und mindestens eine Intronsequenz, Konstrukte, die solche Nukleinsäuremoleküle umfassen, die Nukleinsäuresequenzen oder die Konstrukte umfassende Wirtszellen, Verfahren zum Herstellen von Hämocyanin-Polypeptiden und rekombinante Hämocyanin-Polypeptide.

Hämocyanin ist ein blaues Kupferprotein, das frei gelöst im Blut zahlreicher Mollusken und Arthropoden auftritt und den Sauerstoff transportiert. Von den Mollusken enthalten die Cephalopoden, Chitonen, die meisten Gastropoden sowie einige Bivalvia Hämocyanin. Hämocyanin ist bei den Arthropoden typisch für Arachniden, Xiphosuren, malakostroke Crustaceen und *Scutigera*. Zahlreiche Insektenarten weisen Proteine auf, die sich von Hämocyanin ableiten. Hämocyanine liegen extrazellulär vor und flottieren in der Hämolymphe.

Während das Arthropoden-Hämocyanin bei elektronenmikroskopischer Untersuchung einen Durchmesser von maximal 25 nm hat und eine Untereinheit ein Molekulargewicht von 75.000 Da aufweist, sind Molluskencyanine viel größer. So hat z.B. das Hämocyanin von *Megathura* einen Durchmesser von 35 nm und ist aus 2 Untereinheiten zusammengesetzt. Jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 400.000 Da und ist in acht sauerstoffbindende Domänen aufgeteilt, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 50.000 Da haben. Die Domänen unterscheiden sich immunologisch. Diese Domänen können durch limitierte Proteolyse aus der Untereinheit freigesetzt werden.

Das im Elektronenmikroskop sichtbare Hämocyanin der Gastropoden hat ein Molekulargewicht von ca. 8 Mio. Da und ist ein Di-Dekamer. Im Gegensatz hierzu ist das Hämocyanin der Cephalopoden als isoliertes Dekamer angeordnet, das sich auch in der Quartärstruktur deutlich vom Hämocyanin der Gastropoden unterscheidet.

Von besonderem immunologischen Interesse ist das Hämocyanin der kalifornischen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*, einer „Keyhole Limpet“. Das Hämocyanin

wird deshalb auch als Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) bezeichnet. Hämocyanine sind sehr starke Antigene. Die Immunisierung eines Vertebraten führt zu einer bisher wenig verstandenen, unspezifischen Aktivierung des Immunsystems. Durch die allgemeine Aktivierung des Immunsystems ist es dann möglich, auch eine Immunreaktion gegenüber anderen, bisher tolerierten Fremdstrukturen zu erreichen. KLH wird vor allem als Hapten-Träger verwendet, um so die Bildung von Antikörpern gegen das Hapten zu erreichen.

Neben *Megathura crenulata* gehört auch das Seeohr *Haliotis tuberculata* zur im Hinblick auf die Evolution relativ alten Gruppe der Archaeogastropoda. Es ist bekannt, dass auch *Haliotis* Hämocyanin produziert.

KLH ist ein Gemisch aus zwei unterschiedlichen Hämocyaninen, die als KLH1 und KLH2 bezeichnet werden. Die Untereinheit des KLH1 ist ein 390 kDa Polypeptid, das aus acht globulären Domänen besteht, die entsprechend ihrer Reihenfolge in der Untereinheit mit 1 a bis 1 h bezeichnet werden. KLH2 hingegen weist ein Molekulargewicht von 350 kDa auf und enthält nach neuesten Daten ebenfalls 8 Domänen, die als 2 a bis 2 h bezeichnet werden. *In vivo* bildet jede Art von Untereinheit Homo-Oligomere, wohingegen Hetero-Oligomere nicht beobachtet wurden.

Durch limitierte Proteolyse und gekreuzte Immunelektrophorese der Untereinheit von KLH1 und KLH2 wurden amino-, interne und carboxy-terminale Domänen erhalten, deren amino-terminale Sequenz bestimmt wurde (Söhngen et al., Eur. J. Biochem. 248 (1997), 602-614; Gebauer et al., Zoology 98(1994), 51-68). Die erhaltenen Sequenzen erlauben jedoch nicht den Entwurf sequenzspezifischer Primer und/oder Sonden, die für eine Hybridisierung mit genomischer DNA Erfolg versprechen. Obwohl beide KLH-Typen seit 1991 bzw. 1994 bekannt sind, konnte daher bisher keine Primärstruktur aufgeklärt werden.

Auf DNA-Ebene ist bisher in bezug auf Mollusken nur die cDNA-Sequenz der Hämocyanin-Untereinheit aus dem Cephalopoden *Octopus doffeini* bekannt (Miller et al., J. Mol. Biol. 278 (1998), 827-842). *Octopus doffeini* ist phylogenetisch von den Archaeogastropoden sehr weit entfernt. Eine Hämocyanin-Gensequenz aus Mollusken ist bisher überhaupt nicht bekannt.

Wie von Miller et al. supra, beschrieben, ist es sowohl schwierig, eine einzige funktionelle Domäne (Funktionelle Einheit = Domäne; auch „funktionelle Domäne“ genannt) zu isolie-

ren als auch Gewebe zu erhalten, das zur Aufreinigung von mRNA für die cDNA-Sequenzierung geeignet ist.

Bei der Analyse des Hämocyanins aus *Megathura crenulata* besteht eine weitere Schwierigkeit darin, dass die Versuchstiere ein Alter von 4 bis 8 Jahren erreicht haben müssen, um ihnen erstmals Hämolymphe entnehmen zu können. Nach Entnahme der Hämolymphe wird Hämocyanin bei diesen Tieren nicht nachproduziert. Bisher ist nicht bekannt, wie die Hämocyaninsynthese stimuliert werden könnte. Darüber hinaus ist die Zucht von *Megathura* äußerst aufwendig, da hierfür spezielle Strömungsbecken erforderlich sind.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel und Wege bereitzustellen, um Hämocyanin und/oder Domänen davon in ausreichender Menge und kostengünstig produzieren zu können. Dies umfasst die weitere Aufgabe, ein Verfahren anzugeben, mit dem dieses Hämocyanin hergestellt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz und mindestens eine Intronsequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus

- (a) Nukleinsäuresequenzen, die aus der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen ausgewählt sind oder diese enthalten:

SEQ ID NO:1 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),

SEQ ID NO:2 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:3 (HtH1 Domäne c),

SEQ ID NO:4 (HtH1 Domäne d),

SEQ ID NO:5 (HtH1 Domäne e),

SEQ ID NO:6 (HtH1 Domäne f),

SEQ ID NO:7 (HtH1 Domäne g),

SEQ ID NO:8 (HtH1 Domäne h),

SEQ ID NO:9 (partielle HtH2 Domäne b),

SEQ ID NO:10 (HtH2 Domäne c),

SEQ ID NO:11 (HtH2 Domäne d),
SEQ ID NO:12 (HtH2 Domäne e),
SEQ ID NO:13 (HtH2 Domäne f),
SEQ ID NO:14 (HtH2 Domäne g),
SEQ ID NO:15 (HtH2 Domäne h),
SEQ ID NO:16 (partielle KLH1 Domäne b),
SEQ ID NO:17 (KLH1 Domäne c),
SEQ ID NO:18 (KLH1 Domäne d),
SEQ ID NO:19 (partielle KLH1 Domäne e),
SEQ ID NO:20 (KLH2 Domäne b),
SEQ ID NO:21 (KLH2 Domäne c),
SEQ ID NO:22 (partielle KLH2 Domäne d),
SEQ ID NO:23 (KLH2 Domäne g),
SEQ ID NO:24 (partielle KLH2 Domäne h),
SEQ ID NO:49 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),
SEQ ID NO:50 (partielle HtH2 Domäne a),
SEQ ID NO:51 (HtH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:52 (HtH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:53 (HtH2 Domäne e'),
SEQ ID NO:54 (KLH1 Domäne e'),
SEQ ID NO:55 (KLH1 Domäne f),
SEQ ID NO:56 (KLH1 Domäne g),
SEQ ID NO:57 (KLH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:58 (KLH2 Domäne c'),
SEQ ID NO:59 (KLH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:60 (KLH2 Domäne e),
SEQ ID NO:61 (KLH2 Domäne f),
SEQ ID NO:62 (KLH2 Domäne g'),
SEQ ID NO:80 (HtH1 Domäne a'' + Signalpeptid),
SEQ ID NO:81 (HtH1 Domäne b''),
SEQ ID NO:82 (HtH1 Domäne c''),
SEQ ID NO:83 (HtH1 Domäne d''),
SEQ ID NO:84 (HtH1 Domäne e''),
SEQ ID NO:85 (HtH1 Domäne f''),

SEQ ID NO:86 (HtH1 Domäne g"),
SEQ ID NO:87 (HtH1 Domäne h"),
SEQ ID NO:88 (partielle HtH2 Domäne a"),
SEQ ID NO:89 (HtH2 Domäne b"),
SEQ ID NO:90 (HtH2 Domäne c"),
SEQ ID NO:91 (HtH2 Domäne d"),
SEQ ID NO:92 (HtH2 Domäne e"),
SEQ ID NO:93 (HtH2 Domäne f"),
SEQ ID NO:94 (HtH2 Domäne g"),
SEQ ID NO:95 (HtH2 Domäne h"),
SEQ ID NO:96 (partielle KLH1 Domäne b"),
SEQ ID NO:97 (KLH1 Domäne c"),
SEQ ID NO:98 (KLH1 Domäne d"),
SEQ ID NO:99 (KLH1 Domäne e"),
SEQ ID NO:100 (KLH1 Domäne f"),
SEQ ID NO:101 (KLH1 Domäne g"),
SEQ ID NO:102 (KLH2 Domäne b"),
SEQ ID NO:103 (KLH2 Domäne c"),
SEQ ID NO:104 (KLH2 Domäne d"),
SEQ ID NO:105 (KLH2 Domäne e"),
SEQ ID NO:106 (KLH2 Domäne f"),
SEQ ID NO:107 (KLH2 Domäne g"),
SEQ ID NO:108 (partielle KLH2 Domäne h"),
SEQ ID NO:157 (vollständige HtH2 Domäne a),

- (b) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (a) hybridisieren und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (c) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert sind und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;

- (d) Nukleinsäuresequenzen, die mit einer der unter (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und deren Gegenstrang für ein Polypeptid kodiert, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (e) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (f) Varianten der unter (a) bis (e) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist; und
- (g) Kombinationen mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen.

Vorzugsweise ist die Intronsequenz aus folgenden Sequenzen ausgewählt:

- (i) Nukleinsäuresequenzen, die aus der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen ausgewählt sind oder diese enthalten:

SEQ ID NO:109 (Intron 1S-1/1S-2 von HtH1),
SEQ ID NO:110 (Intron 1S-2/1A-1 von HtH1),
SEQ ID NO:111 (Intron 1A-1/1A-2 von HtH1),
SEQ ID NO:112 (Intron 1A-2/1A-3 von HtH1),
SEQ ID NO:113 (Intron 1A-3/1A-4 von HtH1),
SEQ ID NO:114 (Intron 1A-4/1B von HtH1),
SEQ ID NO:115 (Intron 1B/1C von HtH1),
SEQ ID NO:116 (Intron 1C/1D von HtH1),
SEQ ID NO:117 (Intron 1D/1E von HtH1),
SEQ ID NO:118 (Intron 1E/1F-1 von HtH1),
SEQ ID NO:119 (Intron 1F-1/1F-2 von HtH1),
SEQ ID NO:120 (Intron 1F-2/1G-1 von HtH1),
SEQ ID NO:121 (Intron 1F-1/1G-2 von HtH1),
SEQ ID NO:122 (Intron 1G-2/1G-3 von HtH1),
SEQ ID NO:123 (Intron 1G-3/1H von HtH1),

SEQ ID NO:124 (Intron in dem 3'UTR-Bereich von Hth1),
SEQ ID NO:125 (Intron 2A-1/2A-2 von Hth2),
SEQ ID NO:126 (Intron 2A-1/2A-3 von Hth2),
SEQ ID NO:127 (Intron 2A-1/2A-4 von Hth2),
SEQ ID NO:128 (Intron 2A-4/2B von Hth2),
SEQ ID NO:129 (Intron 2B/2C von Hth2),
SEQ ID NO:130 (Intron 2C/2D von Hth2),
SEQ ID NO:131 (Intron 2D/2E von Hth2),
SEQ ID NO:132 (Intron 2E/2F-1 von Hth2),
SEQ ID NO:133 (Intron 2F-1/2F-2 von Hth2),
SEQ ID NO:134 (Intron 2F-2/2GF-1 von Hth2),
SEQ ID NO:135 (Intron 2G-1/2G-2 von Hth2),
SEQ ID NO:136 (Intron 2G-2/2G-3 von Hth2),
SEQ ID NO:137 (Intron 2G-3/2H von Hth2),
SEQ ID NO:138 (Intron in dem 3'UTR-Bereich von Hth2),
SEQ ID NO:139 (Intron 1B/1C von KLH1),
SEQ ID NO:140 (Intron 1C/1D von KLH1),
SEQ ID NO:141 (Intron 1D/1E von KLH1),
SEQ ID NO:142 (Intron 1E/1F von KLH1),
SEQ ID NO:143 (Intron 1F-1/1F-2 von KLH1),
SEQ ID NO:144 (Intron 1F-2/1G-1 von KLH1),
SEQ ID NO:145 (Intron 1G-1/1G-2 von KLH1),
SEQ ID NO:146 (Intron 1G-2/1G-3 von KLH1),
SEQ ID NO:147 (Intron 2B/2C von KLH2),
SEQ ID NO:148 (Intron 2C/2D von KLH2),
SEQ ID NO:149 (Intron 2D/2E von KLH2),
SEQ ID NO:150 (Intron 2E/2F von KLH2),
SEQ ID NO:151 (Intron 2F von KLH2),
SEQ ID NO:152 (Intron 2F-2/2G von KLH2),
SEQ ID NO:153 (Intron 2G-1/2G-2 von KLH2),
SEQ ID NO:154 (Intron 2G-2/2G-3 von KLH2),
SEQ ID NO:155 (Intron 2G/2H von KLH2);

- (ii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach
 - (i) hybridisieren;
- (iii) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (i) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (iv) Varianten der unter (i) bis (iii) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten gegenüber den unter (i) unter (iii) angegebenen Sequenzen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen; und
- (v) Kombinationen mehrerer der unter (i) bis (iv) angegebenen DNA-Sequenzen.

Im Nachfolgenden werden einige Begriffe näher erläutert, um klarzustellen, wie sie im Zusammenhang der vorliegenden Anmeldung verstanden werden sollen.

Der Begriff "Hämocyanin", so, wie er nachfolgend in der Beschreibung verwendet wird, umfasst vollständiges Hämocyanin, Hämocyanin-Domänen und/oder Fragmente, Hämocyanin-Mutanten und Fusionsproteine. In bezug auf die Fusionsproteine sind insbesondere solche umfasst, bei denen die Fusion Hämocyanin und Antigene umfasst.

Unter „Domänen“ werden funktionelle Teilsequenzen der Hämocyanin-Untereinheiten verstanden, die beispielsweise durch limitierte Proteolyse voneinander abgetrennt werden können. Weiterhin können sie unterschiedliche immunologische Eigenschaften aufweisen.

Mit den „immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin“ ist die Eigenschaft eines Polypeptids gemeint, in gleicher Weise wie wenigstens eine Domäne von Hämocyanin eine immunologische Antwort des Empfängers zu induzieren, der mit dem Polypeptid immunisiert wird. Unter „immunologischer Antwort“ werden hier T- und/oder B-Zell-Antworten gegen Hämocyanin-Epitope verstanden, wie beispielsweise eine Antikörperproduktion. Die immunologische Reaktion kann beispielsweise beobachtet werden durch Immunisieren eines Säugers, wie z.B. einer Maus, einer Ratte oder eines Kaninchens mit dem entsprechenden Polypeptid und Vergleich der Immunantwort auf das zur Immunisierung verwendete Polypeptid mit der Immunantwort auf natürliche Hämocyanine.

Der Begriff "Intronsequenz" steht sowohl für eine dazwischenliegende Sequenz in einem eukaryotischen Gen als auch für die korrespondierende dazwischenliegende Sequenz im

RNA-Transkript. Die Intronsequenz(en) und die kodierende(n) Sequenz(en) werden gemeinsam transkribiert; der Introntranskript bzw. die Introntranskripte werden dann entfernt, um die funktionelle RNA zu erhalten.

Der Begriff "Antigen" umfasst erfindungsgemäß sowohl Haptene, als auch schwache und starke Antigene. Haptene sind dadurch charakterisiert, dass sie Substanzen niedriger Molekülmasse (kleiner als 4000 Da) sind, jedoch ohne Kopplung an ein Trägermolekül nicht in der Lage sind, eine immunologische Reaktion auszulösen. Schwache Antigene sind Substanzen, die selbst bereits eine immunologische Reaktion auslösen können, deren Potential, eine immunologische Reaktion auslösen zu können, durch Kopplung mit einem Trägermolekül auf Protein- und/oder DNA-Ebene, noch erhöht werden kann.

"His-Tag" bedeutet eine Sequenz von wenigstens 6 Histidin-Aminosäuren, die durch entsprechende Klonierung und Fusion mit einer exprimierbaren Sequenz zu einem Fusionsprotein mit wenigstens 6 His-Resten am NH_2 -Terminus führt, das leicht durch Komplexierung mit einer Ni^{2+} -Säule aufgereinigt werden kann.

"Klonierung" soll alle im Stand der Technik bekannten Klonierungsmethoden umfassen, die hier zum Einsatz kommen könnten, die jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

„Varianten“ einer Nukleinsäure umfassen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen und kodieren für ein Polypeptid, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist. Varianten können künstlich oder natürlich sein. Ein Beispiel für natürliche Varianten stellen allelische Varianten dar.

Unter "rekombinanter Expression in einer geeigneten Wirtszelle" sollen alle im Stand der Technik bekannten Expressionsmethoden in bekannten Expressionssystemen verstanden werden, die hier zum Einsatz kommen könnten, jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören:

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül enthaltene Nukleinsäuresequenz kann genomische DNA oder synthetische DNA sein, wobei unter synthetischen DNA-Sequenzen auch solche verstanden werden, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthalten. Weiter kann es sich bei den Nukleinsäuresequenzen um RNA-Sequenzen handeln, was z.B. für die Expression mittels rekombinanter Vektorsysteme erforderlich sein kann. Die

Nukleinsäuresequenzen gemäß (b) sind beispielsweise erhältlich durch Verwenden einer nachweisbar markierten Sonde, die einer der unter (a) angegebenen Sequenzen oder einem Fragment bzw. deren Gegenstrang entspricht, zum Screening von cDNA-/genomischen DNA-Bibliotheken aus Mollusken oder Arthropoden. Die der cDNA-Bibliothek zugrundeliegende mRNA ist vorzugsweise aus Mollusken-Geweben zu erhalten, die Hämocyanin besonders stark exprimieren, wie z.B. Mantel-Gewebe aus Gastropoden und Branchialdrüsengewebe aus Cephalopoden.

Die Identifizierung positiver genomischer DNA-Klone erfolgt gemäß Standardverfahren. Vgl. Maniatis et al., Molecular Cloning (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die unter (b) oder (d) bzw. (ii) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind z.B. 68°C über Nacht in 0,5 x SSC; 1% Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim); 0,1 % Natriumlaurylsarcosinat und nachfolgendem Waschen mit 2 x SSC; 0,1 % SDS.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäure-Moleküle bereitgestellt, die eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind. Bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 80% homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Besonders bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Insbesondere sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 95% homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuresequenzen bereitgestellt, die mindestens eine Intronsequenz, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (i) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist, umfassen. Bevorzugt ist (bzw. sind) die Intronsequenz(en) wenigstens 80% homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Besonders bevorzugt ist (bzw. sind) die Intronsequenz(en) wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Insbesondere ist (bzw. sind) die Intronsequenz(en) wenigstens 95% homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen.

Erfindungsgemäß bedeutet der Ausdruck „Homologie“ Homologie auf DNA-Ebene, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck „Homologie“ bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Nukleinsäuremolekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der „Homologie“ ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Die Homologie miteinander verwandter Nukleinsäuremoleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt.

Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Homologie zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Homologien verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Nukleinsäuresequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)
Vergleichsmatrix:	Übereinstimmung (matches) = + 10 Nichtübereinstimmung (mismatch) = 0
Lücken-Wert (Gap Penalty):	50
Lückenlängen-Wert: (Gap Length Penalty):	3

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Fehler-Parameter (default parameters) für Nukleinsäuresequenz-Vergleiche.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 60 % wird im Rahmen dieser Anmeldung als 60 % Homologie bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Homologiegrade.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eine Kombination mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen und mindestens einer Intronsequenz, die durch dem Fachmann bekannte Fusion und gegebenenfalls Klonierung erhalten werden können. Diese Kombinationen sind von besonderem Interesse, da die davon kodierten Polypeptide besonders immunogen sind. Insbesondere sind Kombinationen bevorzugt, die mehrere oder alle Domänen in der in der Untereinheit natürlicherweise vorkommenden Reihenfolge (a bis h) aufweisen. Besonders bevorzugt sind dabei Ausführungsformen, in denen die für die Domänen kodierenden Nukleinsäuresequenzen direkt im Raster aneinandergelockt sind, nachdem die Intronsequenz bzw. die Intronsequenzen entfernt wurden.

Weiterhin werden Konstrukte bereitgestellt, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Konstrukt einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht. Die Wahl des Promotors hängt vom zur Expression verwendeten Expressionssystem ab. Generell sind konstitutive Promotoren bevorzugt, jedoch sind auch induzierbare Promotoren wie z.B. der Metallothionein-Promotor möglich.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das Konstrukt ferner eine Antigen-kodierende Nukleinsäuresequenz, die direkt mit der erfindungsgemäßen Hämocyanin-Nukleinsäure verbunden ist. Die Antigen-kodierende Sequenz kann sowohl 5' als auch 3' relativ zur Hämocyanin-Sequenz oder auch an beiden Enden gelegen sein. Sie schließt im gleichen Leseraster entweder unmittelbar an die Hämocyanin-Sequenz an oder ist durch einen Nukleinsäure-Linker unter Wahrung des Leserasters mit ihr verbunden. Durch die Fusion der Antigen-kodierenden Sequenz mit der Hämocyanin-Sequenz ist die Bildung eines Fusionsproteins beabsichtigt, in dem die Antigen-kodierende Sequenz kovalent mit der Hämocyanin-Sequenz verbunden ist. Das erfindungsgemäße Antigen ist hierbei ein medizinisch relevantes Antigen, das beispielsweise ausgewählt ist aus: Tumorantigenen, Virusantigenen und Antigenen bakterieller oder parasitärer Pathogene. Tumorantigene können hierbei beispielsweise Rb und p53 sein. Vorzugsweise stammen die Virusantigene aus immunologisch relevanten Viren, wie z.B. Influenza-Virus, Hepatitis-Virus und HIV. Pathogenantigene sind unter anderem solche aus Säugerpathogenen, insbesondere humanpathogenen Organismen, wie z.B. Plasmodium. Bakterielle Antigene können z.B. von *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydia*, *Streptococci* oder *Staphylococci* stammen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Konstrukt ferner wenigstens ein Teil eines Vektors, insbesondere regulatorische Regionen, wobei der Vektor ausgewählt ist aus: Bacteriophagen wie λ -Derivaten, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Viren und Retroviren, vorzugsweise MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus).

Ferner ist ein Konstrukt bevorzugt, das zusätzlich eine His-Tag-kodierende DNA-Sequenz umfasst, die bei Expression des Konstrukts zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag am NH₂-Terminus des Hämocyanins führt, welches die Aufreinigung des Proteins an einer Nickel-Säule durch Chelat-Bildung erleichtert.

Ferner stellt die Erfindung Wirtszellen bereit, die das Konstrukt enthalten und die zur Expression des Konstruktes geeignet sind. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen wie *E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z.B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungs-

muster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Die durch die Verwendung Glykosylierungs-defizienter oder Glykosylierungs-verringerte Wirtszellen erhaltenen Hämocyanine verfügen möglicherweise über zusätzliche Epitope, die bei vollständiger Glykosylierung ansonsten dem Immunsystem des Empfängers nicht zugänglich sind, so dass Hämocyanine mit verringerter Glykosylierung unter Umständen eine erhöhte Immunogenizität aufweisen. Aus mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt transformierten Pflanzenzellen können transgene Pflanzen oder Pflanzenzellkulturen hergestellt werden, die Hämocyanin-Polypeptide produzieren, beispielsweise Tabak-, Kartoffel-, Tomaten-, Zuckerrüben-, Sojabohnen-, Kaffee-, Erbsen-, Bohnen-, Raps-, Baumwoll-, Reis- oder Maispflanzen bzw. -pflanzenzellkulturen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiter ein Verfahren zum Herstellen eines Hämocyanin-Polypeptids. Dazu wird das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül und/oder das Konstrukt in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und das Protein aus der Wirtszelle oder dem Medium mittels üblicher Verfahren isoliert.

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Expression von DNA-Sequenzen bekannt; vergleiche Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology, Band 62, Humana Press Totowa New Jersey (1995). Die Expression kann sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein, wobei Induktoren wie beispielsweise IPTG und Zn^{2+} dem Fachmann bekannt sind. Das hergestellte Hämocyanin kann, falls ein His-Tag an den NH_2 -Terminus des Hämocyanin fusioniert wurde, durch Chelat-Bildung an einer Nickel-Säule aufgereinigt werden. Verfahren zum Aufreinigen von Hämocyanin, insbesondere KLH, finden sich in Harris et al., Micron 26 (1995), 201-212. Vorzugsweise wird das Hämocyanin durch Ionenaustausch-Chromatographie und/oder Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Die Durchführung dieser Maßnahmen ist dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäß hergestellte Hämocyanin modifiziert. Die Modifikationen umfassen hierbei die Di-, Oligo- und Polymerisierung des monomeren Ausgangsprodukts beispielsweise durch Quervernetzung, z.B. durch Dicyclohexylcarbodiimid oder Pegylierung oder Assoziation (self assembly). Die somit hergestellten Di-, Oligo- und Polymere können voneinander durch Gelfiltration abgetrennt werden. Insbesondere beabsichtigt ist die Bildung von Dekameren, Didekameren oder Multi-Dekameren. Weitere Modifikationen umfassen Seitenketten-Modifikationen, beispielsweise von ϵ -Amino-Lysin-Resten des Hämocyanins, oder Amino- bzw. Carboxy-

terminale Modifikationen. Besonders bevorzugt ist die Modifikation des Hämocyanins durch kovalente Bindung an ein Antigen, wobei das Antigen stöchiometrisch oder nicht-stöchiometrisch mit dem Hämocyanin umgesetzt sein kann. Das Antigen ist vorzugsweise ausgewählt aus Tumorantigenen, Virusantigenen und Pathogenantigenen wie oben ausgeführt. Weitere Modifikationen umfassen posttranslationale Ereignisse, z.B. die Glykosylierung oder die partielle oder vollständige Deglykosylierung des Proteins.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erhaltene Hämocyanin bei rekombinanter Expression in Prokaryonten oder Glykosylierungs-defizienten Eukaryonten nicht-glykosyliert. Ebenfalls in Betracht gezogen wird erfindungsgemäß Hämocyanin, das durch rekombinante Expression in zur Glykosylierung fähigen Eukaryonten wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugerzellen, wie CHO-Zellen oder HeLa-Zellen, glykosyliert ist.

In einer weiteren Ausführungsform werden Hämocyanin-Polypeptide zur Verfügung gestellt, die eine Aminosäuresequenz umfassen, wobei die Aminosäuresequenz von einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodiert wird.

Bevorzugt werden Hämocyanin-Polypeptide zur Verfügung gestellt, die wenigstens eine aus der folgenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz umfassen:

SEQ ID NO:25 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),
SEQ ID NO:26 (HtH1 Domäne b),
SEQ ID NO:27 (HtH1 Domäne c),
SEQ ID NO:28 (HtH1 Domäne d),
SEQ ID NO:29 (HtH1 Domäne e),
SEQ ID NO:30 (HtH1 Domäne f),
SEQ ID NO:31 (HtH1 Domäne g),
SEQ ID NO:32 (HtH1 Domäne h),
SEQ ID NO:33 (partielle HtH2 Domäne b),
SEQ ID NO:34 (HtH2 Domäne c),
SEQ ID NO:35 (HtH2 Domäne d),
SEQ ID NO:36 (HtH2 Domäne e),
SEQ ID NO:37 (HtH2 Domäne f),
SEQ ID NO:38 (HtH2 Domäne g),

SEQ ID NO:39 (HtH2 Domäne h),
SEQ ID NO:40 (partielle KLH1 Domäne b),
SEQ ID NO:41 (KLH1 Domäne c),
SEQ ID NO:42 (partielle KLH1 Domäne d),
SEQ ID NO:43 (partielle KLH1 Domäne e),
SEQ ID NO:44 (KLH2 Domäne b),
SEQ ID NO:45 (KLH2 Domäne c),
SEQ ID NO:46 (partielle KLH2 Domäne d),
SEQ ID NO:47 (KLH2 Domäne g),
SEQ ID NO:48 (partielle KLH2 Domäne h),
SEQ ID NO:63 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),
SEQ ID NO:64 (HtH1 Domäne h'),
SEQ ID NO:65 (partielle HtH2 Domäne a),
SEQ ID NO:156 (vollständige HtH2 Domäne a),
SEQ ID NO:66 (HtH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:67 (HtH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:68 (HtH2 Domäne e'),
SEQ ID NO:69 (partielle KLH1 Domäne b'),
SEQ ID NO:70 (KLH1 Domäne e'),
SEQ ID NO:71 (KLH1 Domäne f),
SEQ ID NO:72 (KLH1 Domäne g),
SEQ ID NO:73 (KLH1 Domäne h),
SEQ ID NO:74 (KLH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:75 (KLH2 Domäne c'),
SEQ ID NO:76 (KLH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:77 (KLH2 Domäne e),
SEQ ID NO:78 (KLH2 Domäne f),
SEQ ID NO:79 (KLH2 Domäne g')
SEQ ID NO:158 (teilweise KLH2 Domäne h)

oder ein Fragment einer dieser Sequenzen, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist.

Hämocyanin-Polypeptide, deren Sequenz über einen Teilbereich von mindestens 90 Aminosäuren mindestens 60% oder 70%, vorzugsweise mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% oder 95% Homologie zu einer der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NO:25 bis 48 und SEQ ID NO:63 bis 79 aufweist, werden von der Erfindung ebenfalls umfasst.

In diesem Zusammenhang bezieht sich der Ausdruck "mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% Homologie" auf Übereinstimmung auf der Ebene der Aminosäuresequenz, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck „Homologie“ bezeichnet hier den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehrerer Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird, wobei unter Übereinstimmung sowohl identische Übereinstimmung als auch konservativer Aminosäure-Austausch zu verstehen ist. Der Prozentsatz der „Homologie“ ergibt sich aus dem Prozentsatz übereinstimmender Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Der Begriff "konservativer Aminosäure-Austausch" bezieht sich auf einen Austausch eines Aminosäurerestes durch einen anderen Aminosäurerest, wobei der Austausch nicht zu einer Änderung der Polarität oder Ladung führt. Ein Beispiel für einen konservativen Aminosäure-Austausch ist der Austausch eines unpolaren Aminosäurerestes durch einen anderen unpolaren Aminosäurerest.

Die Homologie miteinander verwandter Polypeptid-Moleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Homologie zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12 (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. *et al.*, J. Molec Biol 215:403/410 (1990)). Das

BLAST X Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., *et al.*, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. 215:403/410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Homologie verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Sequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)
Vergleichsmatrix:	BLOSUM 62 von Henikoff und Henikoff, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 89:10915-10919 (1992)
Lücken-Wert (Gap Penalty):	12
Lückenzlängen-Wert (Gap Length Penalty):	4
Schwellenwert der Ähnlichkeit:	0

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Homologie-Wert nicht verringern. Bei sehr kurzen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100.000 (expected value) zu erhöhen und gegebenenfalls die Wortlänge (word size) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 60 % wird im Rahmen dieser Anmeldung als 60 % Homologie bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Homologiegrade.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung Hämocyanin-Polypeptide, erhältlich durch das rekombinante Herstellungsverfahren oder Modifikationen davon, bereit.

Bevorzugt sind Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 25 bis 32 umfassen, wobei die Sequenz mit SEQ ID NO:25 durch SEQ ID NO:63 und/oder SEQ ID NO:32 durch SEQ ID NO:64 ersetzt sein kann. Bevorzugt sind ebenfalls Hämocyanin-Polypeptide, die entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 33 bis 39 oder die Sequenzen SEQ ID NO:65, 66, 34-39 umfassen, wobei SEQ ID NO:35 durch SEQ ID NO:67 und/oder SEQ ID NO:36 durch SEQ ID NO:68 ersetzt sein kann. Besonders bevorzugt handelt es sich bei diesen Hämocyanin-Polypeptiden um Hämocyanin 1 oder 2 aus Haliotis tuberculata.

Insbesondere bevorzugt ist Hämocyanin 1 aus *Haliotis tuberculata*, das ein scheinbares Molekulargewicht von 370 kDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist. Weiterhin ist insbesondere Hämocyanin 2 aus *Haliotis tuberculata* bevorzugt, das ein scheinbares Molekulargewicht von 370 kDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist. Die Hämocyanine sind durch das in den Beispielen beschriebene selektive Dissoziationsverfahren aus Gesamt-Hämocyanin aus *Haliotis tuberculata* erhältlich.

Weiterhin bevorzugt sind Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 40 bis 43 oder die Sequenzen SEQ ID NO:40 bis 43 und SEQ ID NO:71 bis 73 umfassen, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:40 durch SEQ ID NO:66 und/oder SEQ ID NO:43 durch SEQ ID NO:70 ersetzt sein kann. Bevorzugt sind ebenfalls Hämocyanin-Polypeptide, die entweder jede der Sequenzen SEQ ID NO: 44 bis 48 oder die Sequenzen SEQ ID NO:44 bis 46, 77, 78, 47, 48 umfassen, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:44 durch SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:45 durch SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:46 durch SEQ ID NO:76 und/oder SEQ ID NO:47 durch SEQ ID NO:79 ersetzt sein kann.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei diesen Hämocyanin-Polypeptiden um vollständiges Hämocyanin 1 (KLH1) oder 2 (KLH2) aus Megathura crenulata.

Weiterhin wird nicht-glykosyliertes und glykosyliertes Hämocyanin-Polypeptid, erhältlich durch Expression in zur Glykosylierung fähigen bzw. unfähigen Wirtszellen, bereitgestellt. Je nach vorgesehener Verwendung des Hämocyanin-Polypeptids kann das Glykosylierungsmuster von Hefe, insbesondere methylotropher Hefe, von Pflanzenzellen oder von COS- oder HeLa-Zellen bevorzugt sein.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle und physiologisch verträgliche Zusatzstoffe, die im Stand der Technik bekannt sind, enthalten. Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen zur unspezifischen Immunstimulierung in Form einer Gentherapie eingesetzt, wobei nach Transformation mit einem geeigneten Vektor Hämocyanin-Polypeptide exprimiert werden und zur Antigenisierung des Gewebes dienen.

Insbesondere sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das mit einer Antigen-kodierenden DNA-Sequenz verbunden ist, zur spezifischen Immunisierung gegen dieses Antigen vor. Die Immunisierung beruht hierbei, ohne an diese Theorie gebunden zu sein, auf der unspezifischen Stimulierung des Immunsystems durch Hämocyanin-Polypeptid-Epitope und die weitergehende spezifische Immunisierung durch Erkennung von Antigen-Epitopen durch das Immunsystem.

Eine solche Immunisierung ist besonders wertvoll im Hinblick auf Pathogen-Antigene, ganz besonders aber im Hinblick auf Tumorantigene. Die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen ergibt sich auch aus der Kreuzreaktivität der gebildeten Hämocyanin-spezifischen Antikörper mit Kohlenhydratresten, die auf der Oberfläche von Tumoren auftreten, wie z.B. dem Thomsen-Friedenreich-Antigen, das bei der Mehrzahl von humanen Tumoren wie Epithelialkarzinomen, Ovarialkarzinom, Kolonrektalkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinom auftritt.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen zum Behandeln von parasitären Erkrankungen wie Schistosomiasis und für die Kokain-Mißbrauchsvorsorge eingesetzt werden.

Als weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt, die ein erfindungsgemäßes Hämocyanin-Polypeptid in Verbindung mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Zusatzmitteln enthalten. Wie oben bereits erwähnt, kann ein solches Hämocyanin-Polypeptid aus einer vollständigen Hämocyanin-Untereinheit, aus einer oder mehreren Domänen sowie aus einem oder mehreren Fragmenten solcher Domänen bestehen, vorausgesetzt, dass diese Fragmente noch die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines

Hämocyanins aufweist. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung eignet sich durch die entweder unspezifische Immunstimulation, die allein auf das Hämocyanin zurückzuführen ist, oder durch die spezifische Immunreaktion auf mit dem Hämocyanin assoziierte Antigene z.B. als Antiparasitenmittel, Antivirumittel oder Antitumormittel. So kann sie z.B. zum Behandeln von Schistosomiasis, Epithelialkarzinomen, Ovarialkarzinom, Kolonrektalkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinomen eingesetzt werden, eignet sich jedoch auch zum Behandeln von Bluthochdruck. Die Behandlung von Bluthochdruck wird erreicht, indem eine Immunisierung mit Hilfe von erfindungsgemäßen Hämocyanin- β -adrenergen-Rezeptorpeptid-Konstrukten und/oder Fusionsproteinen durchgeführt wird.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen als Impfstoffe verwendet. Sie können somit einen wertvollen Beitrag zur Prophylaxe von durch bekannte Pathogene verursachte Erkrankungen leisten. Dies gilt insbesondere für pharmazeutische Zusammensetzungen, in denen ein Hämocyanin-Polypeptid an ein Virus, Virusbestandteil, abgetötete Bakterien, Bakterienbestandteile, insbesondere Oberflächenproteine aus Virus- oder Bakterienhüllen, DNA, DNA-Bestandteile, anorganische oder organische Moleküle, z.B. Kohlenhydrate, Peptide und/oder Glykoproteine gebunden ist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung zur Kokain-Mißbrauchsvorsorge verwendet.

Zur Applikation sowohl der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als auch der Hämocyanin-Polypeptide eignen sich insbesondere Liposomen. Dementsprechend umfasst die vorliegende Erfindung Liposomen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Konstrukt oder ein erfindungsgemäßes Hämocyanin-Polypeptid umfassen.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren zum Herstellen von Liposomen, die für pharmazeutische Zwecke verwendbar sind, bekannt. Die Selektivität der die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Hämocyanin-Polypeptide enthaltenden Liposomen kann durch den zusätzlichen Einbau von Zellerkennungsmolekülen in die Liposomen erhöht werden, die selektiv an Zielzellen binden. Hierzu eignen sich insbesondere Rezeptor-

liganden, die an Rezeptoren der Zielzellen binden, oder, besonders im Fall von Tumoren, Antikörper, die gegen Oberflächenantigene der jeweils anvisierten Zielzellen gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Hämocyanin-Polypeptide sind außerdem als Trägermolekül für Arzneistoffe, wie z. B. Cytostatika, vorgesehen. Die Vergrößerung des Molekulargewichtes verlängert die physiologische Halbwertszeit der Arzneistoffe erheblich, da der Verlust durch Ultrafiltration in der Niere deutlich verringert ist.

Die Zubereitung der Impfstoffe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren; in einigen Ausführungsformen ist die zusätzliche Verwendung von Adjuvantien wie z. B. Freund-sches Adjuvant oder Polysacchariden vorgesehen.

Die Erfindung stellt ferner Antikörper bereit, die spezifisch mit dem erfindungsgemäßen Hämocyanin-Polypeptid reagieren und erhältlich sind durch Immunisieren eines Versuchstieres mit einem Hämocyanin-Polypeptid. Polyklonale Antikörper können durch Immunisieren beispielsweise von Kaninchen und anschließendem Gewinnen von Antisera erhalten werden. Monoklonale Antikörper können gemäß Standardverfahren durch Immunisieren von z.B. Mäusen, Gewinnen und Immortalisieren der Milzzellen und Klonieren der Hybridome, die für Hämocyanin spezifische Antikörper produzieren, erhalten werden.

Weiterhin wird ein Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumor-spezifischer DNA in einer Zelle bereitgestellt, das die Schritte umfasst:

- a) das Inkontaktbringen zellulärer DNA und/oder zellulären Proteins mit einer Sonde umfassend das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül und/oder den erfindungsgemäßen Antikörper und
- b) das Nachweisen der spezifischen Bindung.

Vorzugsweise ist der nachzuweisende Tumor ein Harnblasenkarzinom, Epithelialkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Kolonrektalkarzinom.

Es ist beabsichtigt, mit den nachfolgenden Figuren und Beispielen die Erfindung zu erläutern, diese jedoch in keiner Weise einzuschränken. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die ebenfalls umfasst sind.

Fig. 1 zeigt die Charakterisierung und Aufreinigung von *Haliotis tuberculata* Hämocyanin (HtH):

- (a) Elektronenmikroskopie von negativ gefärbtem Gesamt-HtH, das durch Ultrazentrifugation von Zell-freier Hämolymphe aufgereinigt wurde;
- (b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von HtH1 im Vergleich zu KLH (MW 370 kDa);
- (c) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5 % Polyacrylamid) der HtH-Untereinheiten-Präparation, wobei die Anode am unteren Rand liegt;
- (d) Gekreuzte Immunelektrophorese der beiden HtH-Untereinheiten unter Verwendung von anti-HtH-Antikörpern aus Kaninchen;
- (e) Elektronenmikroskopie der verbleibenden HtH1-Didekamere (weiße Pfeile) nach der selektiven Dissoziation von HtH2 (schwarze Pfeile);
- (f) Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie (Biogel A15m) in Gegenwart von Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol-Lösung (pH 5,9) nach der selektiven Dissoziation von HtH2 in seine Untereinheit und nachfolgender Anreicherung von HtH1 durch Ultrazentrifugation;
- (g) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (6,5 % Polyacrylamid) von durch Gelchromatographie aufgereinigten HtH1- und HtH2-Untereinheiten im Vergleich zum Ausgangsmaterial;
- (h,i) Gekreuzte Immunelektrophorese von chromatographisch aufgereinigten HtH-Untereinheiten; und
- (j,m) Gekreuzte Immunelektrophorese der aufgereinigten HtH-Untereinheiten unter Verwendung von anti-KLH-Antikörpern aus Kaninchen, die für KLH1 bzw. KLH2 spezifisch sind.

Fig. 2 zeigt die Untersuchung der Untereinheiten-Organisation von HtH1, wobei für die Immunelektrophorese anti-HtH1-Antikörper aus Kaninchen verwendet wurden und die Anode sich auf der linken Seite befand:

- (a) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe von Elastase;
- (b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von Elastase-gespaltener HtH1-Untereinheit;

- (c,d,g-j,l,n,p) Gekreuzte Immunelektrophorese der Elastase-Spaltprodukte der Hth1-Untereinheit;
- (e) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von Hth1 mit Hilfe von V8 Protease;
- (f) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von V8 Protease-gespaltener Hth1-Untereinheit und
- (k,m,o) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von Hth1 mit Hilfe der drei angegebenen Proteasen.

Fig. 3 zeigt die Auftrennung von proteolytischen Spaltprodukten der Untereinheit Hth1 mit Hilfe von HPLC.

Fig. 4 zeigt die genomische Sequenz des Hth1-Gens.

Fig. 5 zeigt die abgeleitete Primärstruktur des Hth1-Proteins.

Fig. 6 zeigt die genomische Sequenz des Hth2-Gens.

Fig. 7 zeigt die abgeleitete Primärstruktur des Hth2-Proteins.

Fig. 8 zeigt die genomische Sequenz des KLH1-Gens.

Fig. 9 zeigt die abgeleitete Primärstruktur des KLH1-Proteins.

Fig. 10 zeigt die genomische Sequenz des KLH2-Gens.

Fig. 11 zeigt die abgeleitete Primärstruktur des KLH2-Proteins.

BEISPIELE

Material und Methoden

1. Gewinnen der Hämolymphe und Isolieren von Hämocyanin

Individuen des europäischen Seeohrs *Halotis tuberculata* aus dem Bereich der französischen Atlantikküste wurden von S.M.E.L (Blainville sur Mer, Frankreich) und der Firma Biosyn (Fellbach, Deutschland) bereitgestellt. Die Tiere wurden in einem 300 l Seewasser-Aquarium bei 17 ° C gehalten und mit Braunalgen gefüttert. Zur Entnahme der Hämolymphe

phe wurden die Seeohren in einem verschlossenen Plastiksack auf Eis gestellt. Nach einer Stunde waren große Volumina an Hämolymphe durch ihre Haut sezerniert worden. Es stellte sich heraus, dass das durch dieses Verfahren erhaltene Hämocyanin identisch ist mit dem Hämocyanin, das durch Einschnneiden einer Mulde in den Fuß heruntergekühlter Meeresschnecken unter Verwendung einer Skalpellklinge gesammelt werden konnte. Die Blutzellen wurden von der Hämolymphe durch Zentrifugation bei 800 g über 30 min bei 4 ° C abgetrennt. Das gesamte Hämocyanin wurde sofort danach durch präparative Ultrazentrifugation bei 30000 g über 4 Stunden bei 4 ° C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das blaue Hämocyanin-Pellet wurde über Nacht in "Stabilisierungspuffer" (0,05 M Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,15 M NaCl, 1 mM PMSF, pH 7,4) suspendiert und bei 4 ° C gelagert.

Intaktes HtH1 wurde unter Verwendung des von Harris et al., 1995, supra, beschriebenen Verfahrens aus dem gesamten HtH durch selektive Dissoziation von HtH2 in Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol (1%/0,2%)-Lösung, pH 5,9 und nachfolgender Ultrazentrifugation erhalten. Das entstandene, teilweise aufgereinigte HtH1-Pellet wurde aufgelöst und durch Gelfiltration auf einer Biogel A15m-Vorrichtung zur Homogenität aufgereinigt. Der letzte Schritt ergab geringe Mengen von aufgereinigtem HtH2. Natives HtH1 und HtH2 wurde durch Dialyse gegen "Dissoziationspuffer" (0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6) bei 4 ° C über Nacht quantitativ in die Untereinheiten dissoziiert; die Gegenwart von EDTA war nicht erforderlich. 1 mM PMSF wurde bei jeder Stufe der Aufreinigung hinzugefügt, um die Proteolyse zu hemmen.

2. Elektronenmikroskopie

Konventionelles "negative staining" wurde mit dem Einzel-Tropfen-Verfahren (Harris und Horne in Harris, J.R. (Herausgeber) Electron microscopy in biology, (1991), IRL Press Oxford, S. 203-228) durchgeführt. Kohlenstoffträger-Filme wurde anfänglich über 20 Sekunden glühentladen, um sie hydrophil und für das Protein adsorptiv zu machen. Man läßt die Proteinproben an den Kohlenstofffilmen über 60 Sekunden adsorbieren. Sodann werden die Puffersalze durch sequentielles Waschen mit vier aufeinanderfolgenden 20 µl Wassertropfen entfernt. Die Gitter werden schließlich mit einem 20 µl Tropfen 5 % wäßrigen Ammoniummolybdat, enthaltend 1 % Trehalose (pH 7,0) negativ gefärbt und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wird ein Zeiss EM 900 Transmissionselektronenmikroskop verwendet.

3. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immunelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde gemäß des Verfahrens von Laemmli (Nature 227 (1970), 670-685) durchgeführt. Zur nativen PAGE wurde ein alkalisches System gemäß Markl et al. (1979) J. Comp. Physiol. 133 B, 167-175 mit einem 0,33 M Tris/Borat, pH 9,6 als Gelpuffer und 0,065 M Tris/Borat, pH 9,6 als Elektrodenpuffer verwendet. Gekreuzte und "crossed-line" Immunelektrophorese (IE) wurden gemäß Weeke (Scand. J. Immunol. 2 (1973), Suppl. 1, 47-56) bzw. Kroll (Scand. J. Immunol. 2, Suppl. 1 (1973), 79-81) durchgeführt. Kaninchenantikörper wurden von Charles River Deutschland (Kisslegg, Deutschland) gegen dissoziiertes Gesamt-HtH und aufgereinigtes HtH1 erzeugt. Das Immunisierungsverfahren wurde durchgeführt gemäß Markl und Winter (J. Comp. Physiol. 159B (1989), 139-151).

4. Limitierte Proteolyse und Isolierung der Fragmente

Die limitierte Proteolyse wurde bei 37 ° C in 0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6 durch Hinzufügen eines der nachstehenden Enzyme (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), die in 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,0 gelöst waren, durchgeführt: *Staphylococcus aureus* V8-Protease Typ XVII (8400), Papain Typ II aus Papaya-Milch (P-3125), Rinder-Pankreas-Elastase Typ IV (E-0258), Chymotrypsin und Trypsin. Die Hämocyanin-Konzentration lag zwischen 1 und 10 mg/ml. Die Endkonzentration des Enzyms betrug 2 % (Gewicht/Gewicht). Die Proteolyse wurde nach 5 Stunden durch Einfrieren auf -20 ° C beendet. Das HPLC-Verfahren wurde auf einer Vorrichtung von Applied Biosystems (BAI, Bensheim, Deutschland) durchgeführt, die mit einem Modell-1000S-Dioden-Array-Detektor ausgestattet war. Die proteolytischen Fragmente wurden auf kleine Mono-Q-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen (Pharmacia, Freiburg, Deutschland), die mit 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert worden war und mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (0,0 M - 0,5 M CaCl) im gleichen Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert wurden. Alternativ wurden die proteolytischen Fragmente durch Ausschneiden der Banden aus nativen PAGE-Gelen (Markl et al., 1979) J. Comp. Physiol. 133 B, 167-175 isoliert, nachdem sie zuvor mit dem Roti-White-System (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemäß Fernandez-Patron et al. (1995) Anal. Biochem. 224, 203-211 invers-gefärbt worden waren. Zur nachfolgenden Spaltung mit einem zweiten Enzym wurden die isolierten Fragmente zuerst Übernacht gegen 0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6 dialysiert, um NaCl zu entfernen.

5. Aminosäuresequenzanalyse

Die durch das HPLC-Verfahren erhaltenen Proteine wurden in SDS-enthaltendem Probenpuffer denaturiert und durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970, supra; 7,5 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Um die Blockierung des NH₂-Terminus zu verhindern wurde 0,6 % (Gewicht/ Gewicht) Thioglykolsäure zum Kathodenpuffer (Walsh et al., Biochemistry 27 (1988), 6867-6876) hinzugefügt. Die Proteinbanden wurden durch Elektro-Transfer auf ProBlot-Membranen (Applied Biosystems, Deutschland) in einer vertikalen Blotting-Kammer übertragen (25 mM Borat-Puffer, pH 8,8, enthaltend 2 mM EDTA; 10 min/100 mA, 15 min/200 mA, 12 h/300 mA). Der Nachweis der einzelnen Polypeptide auf den Membranen wurde mit der Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Die interessierenden Polypeptid-Banden wurden ausgeschnitten und in einer 477A-Protein-Sequenzier-Vorrichtung von Applied Biosystems sequenziert. Die Mengen der auf die Sequenziervorrichtung aufgetragenen Polypeptide lag im unteren pmol-Bereich.

6. cDNA-Klonierung und Sequenzanalyse

Eine Lambda-cDNA-Expressionsbibliothek wurde aus Poly(A⁺)-RNA aus *Halotis* Mantelgewebe unter Verwendung des Vektors Lambda ZAP Express[®] gemäß den Herstelleranweisungen (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die Klone wurden unter Verwendung von HtH-spezifischen Kaninchenantikörpern isoliert. Die Nukleotidsequenzierung wurde auf beiden Strängen unter Verwendung des Taq Dye deoxy Terminator[®]-Systems durchgeführt. Die Anordnung der Sequenzen wurde mit der Software CLUSTAL W (1.7)[®] und TREEVIEW[®] (Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22 (1994), 4673-4680) durchgeführt.

Beispiel 1:

Isolierung von HtH und Auftrennung zweier unterschiedlicher Typen (HtH1 und HtH2)

Die Hämolymphe wurde aus adulten Seeohren gewonnen. Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation entfernt und das Hämocyanin wurde sodann durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Das blaue Hämocyanin-Pellet wurde in "Stabilisierungspuffer" (pH 7,4) wieder aufgelöst und in der Elektronenmikroskopie untersucht (Figur 1a). Es bestand hauptsächlich aus typischen Di-Dekameren, begleitet von einem kleinen Anteil an Dekameren und Tridekameren. Die Denaturierung in 2 % SDS in Gegenwart reduzierender Substanzen

und anschließender SDS-PAGE-Trennung ergab eine einzige Bande, die dem Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 370 kDa entsprach, welches nur geringfügig unterhalb des scheinbaren Untereinheiten-Gewichts von KLH (Figur 1b) liegt. Die vollständige Dissoziation der Oligomere wie der Di-Dekamere in die nativen Polypeptide (Untereinheiten) wurde erreicht durch Übernacht-Dialyse von HtH gegen "Dissoziationspuffer" (pH 9,6). Natives PAGE-Verfahren, das auf diese Proben angewendet wurde, ergab eine Haupt- und eine Neben-Komponente (Figur 1c). Die gekreuzte Immunelektrophorese (gekreuzte IE) unter Verwendung von gegen aufgereinigtes Gesamt-HtH-erzeugten polyklonalen Kaninchen-Antikörpern zeigte zwei Komponenten, die immunologisch unterschiedlich sind, jedoch die klassische Reaktion einer teilweise immunologischen Identität aufweisen (Figur 1d). Ihre präparative Isolierung (Figur 1e-i) zeigte, dass sie die Untereinheiten von zwei unterschiedlichen HtH-Typen darstellen, bezeichnet als HtH1 und HtH2, und die Muster der nativen PAGE- und gekreuzten IE-Verfahren konnten jeder einzelnen zugeordnet werden (Figur 1c, d).

Die Auftrennung von HtH1 und HtH2 wurde gemäß des Verfahrens zur selektiven Dissoziation gemäß Harris et al., 1995, supra, durchgeführt. In Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol war HtH1 im Oligomeren-Zustand (Di-Dekamere) vollständig stabil, wohingegen HtH2 vollständig in die Untereinheiten dissoziierte (Figur 1e). Dies ermöglichte die quantitative Sedimentation von HtH1 in der Ultrazentrifuge, wohin gegen der größte Teil des HtH2 im Überstand verblieb. Aus dem wieder aufgelösten Pellet wurden große Mengen an HtH1 durch Gelfiltrationschromatographie zur Homogenität aufgereinigt, welche auch geringe Mengen an reinem HtH2 ergab (Figur 1f). Die Fraktionen wurden durch native PAGE (Figur 1g) und gekreuzte IE (Figur 1h, i) untersucht. Das Verfahren der selektiven Dissoziation von HtH2 entfernte sämtliche Tri-Dekamere aus den Proben, welches nahelegt, dass die letzteren aus HtH2, jedoch nicht aus HtH1 aufgebaut sind (Figur 1e). Das selektive Dissoziationsverhalten von HtH2 und auch die Fähigkeit, Aggregate zu bilden, die größer als *in vivo*-Di-Dekamere sind, entspricht den Eigenschaften von KLH2. Umgekehrt ähnelt die Stabilität von HtH1 unter diesen Bedingungen und seine Unfähigkeit, sich zu größeren Aggregaten als Di-Dekameren zu assemblieren, dem Verhalten von KLH1. Diese Verwandtschaft wird weiter belegt durch die Reaktion von Anti-KLH1 bzw. Anti-KLH2 Antikörpern gegen die beiden HtH-Typen (Figur 1j-m).

Beispiel 2:**Analyse der Organisation der HtH1-Untereinheit**

Die acht funktionellen Einheiten (FU's, häufig als "funktionelle Domänen" bezeichnet), die eine Mollusken-Hämocyanin-Untereinheit bilden, unterscheiden sich in der Primärstruktur und weisen keine immunologische Kreuz-Reaktivität auf, wie sich aus gekreuzter IE ergibt. Im Fall der aufgereinigten HtH1 Untereinheit (Figur 1g, h) wurden geringe Konzentrationen fünf unterschiedlicher Proteasen (Elastase, V8-Protease, Papain, Trypsin und Chymotrypsin) verwendet, welche die Peptid-Bindungen zwischen benachbarten FU's von KLH1 und KLH2 gespalten hatten (Gebauer et al., 1994, supra, Söhnngen et al., 1997, supra). Die Spaltprodukte wurden durch gekreuzte IE und SDS-PAGE (Fig. 2) untersucht. Elastase-Behandlung erzeugt acht einzelne FU's, abgeleitet aus der Anzahl an unterschiedlichen Immunpräzipitations-Gipfeln in der gekreuzten IE (Fig. 2a) und mit dem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 50 kDa des Hauptteils der Spaltprodukte in SDS-PAGE (Fig. 2b). Ein weiterer Präzipitationsgipfel wurde als FU-Dimer erkannt, welches durch unvollständige Spaltung des Segments ab (Fig. 2a) entstand. Durch HPLC-Verfahren mit einer Mono-Q-Säule (Fig. 3a) wurden zwei der Elastase-Spaltprodukte in einer ausreichenden Reinheit erhalten, um durch "crossed-line-IE" ihre klare Zuordnung zu zwei der acht Präzipitationsgipfel (Fig. 2c,d) zu ermöglichen. Die anderen vier Proteasen wiesen unterschiedliche Spaltmuster auf, die aus Gemischen einzelner FU's und größerer Fragmente, enthaltend zwei, drei oder mehrere FU's bestanden (z.B. Fig. 2 e,f). Viele von ihnen waren durch das HPLC-Verfahren in ausreichender Menge angereichert (Fig. 3b-e), um ihre Identifikation in ihren entsprechenden SDS-PAGE- und gekreuzten IE-Mustern zu ermöglichen. Eine Anzahl dieser Komponenten wurde N-terminal durch Blot-Transfer von SDS-Gelen auf Pro-Blot®-Membrane (Tabelle I) sequenziert. Die Resultate wurden mit N-terminalen Sequenzen verglichen, die aus dem scheinbar orthologen Protein in *Megathura crenulata*, KLH1 (Tabelle I), erhalten worden waren, von dem die vollständige FU-Anordnung verfügbar ist (Söhnngen et al., 1997, supra; vgl. Fig. 5b). Das Ergebnis des gesamten Ansatzes führte zur Bestimmung der vollständigen FU-Anordnung innerhalb der HtH1-Untereinheit (Fig. 2a).

Insbesondere ergab die Spaltung der HtH1-Untereinheit (1-abcdefgh) mit V8-Protease vier Präzipitationsgipfel in der gekreuzten IE (Fig. 2e). Das SDS-PAGE-Verfahren zeigte fünf unterschiedliche Fragmente (Fig. 2f): 220 kDa (5 FU's), 185 kDa (4 FU's), 100 kDa (2 FU's),

55 kDa(1 FU) und 46 kDa(1 FU). Das 100 kDa-Fragment wurde durch das HPLC-Verfahren (Fig. 3b) isoliert und durch N-terminale Sequenzierung als 1-ab identifiziert, da die Sequenz identisch zu derjenigen der intakten Untereinheit war (Tabelle I). In dem "crossed-line" IE-Verfahren verschmolz 1-ab mit drei Präzipitationsgipfeln des Elastase-Spaltmusters. Aufgrund der Auswertung ergab sich, dass sie die Fragmente 1-ab, 1-a bzw. 1-b darstellen (Fig. 2g). Jedoch verblieb es unklar, welcher Gipfel 1-a und welcher 1-b darstellt. In einem zweiten Schritt wurde das HPLC-aufgereinigte 1-ab durch Elastase in seine Komponenten-FU's gespalten, aus denen eine durch das native PAGE-Gel-Streifenverfahren eluiert werden konnte und dem Elastase-Muster durch das "crossed-line" IE-Verfahren (Fig. 2h) zugeordnet und N-terminal sequenziert wurde. Diese Komponente wies die gleiche N-terminale Sequenz wie die gesamte Untereinheit auf und war deshalb identisch zu 1-a. Somit ist die zweite FU des 100 kDa-Fragments 1-b (Fig. 2a; Tabelle I). Ebenso wurden HPLC-aufgereinigtes 1-c und 1-h erhalten (Fig. 3b), durch N-terminale-Sequenzähnlichkeiten zu den entsprechenden FU's in KLH1 (Tabelle I) identifiziert und durch das "crossed-line" IE-Verfahren ihren entsprechenden Präzipitationsgipfeln in dem Elastase-Muster zugeordnet (Fig. 2i,j). Weiterhin wurden 1-a, 1-b, 1-c und 1-h identifiziert (Fig. 2a). Unter Verwendung von Papain zur Untereinheiten-Spaltung wurden fünf unterschiedliche Gipfel in dem gekreuzten IE-Verfahren (Fig. k) erhalten. Aus einer solchen Probe wurde ein 100 kDa-Fragment (2 FU's) durch das HPLC-Verfahren (Fig. 3c) aufgereinigt, welches gemäß des "crossed-line" IE-Verfahrens das bereits identifizierte FU 1-h und eine der vier noch nicht identifizierten FU's enthielt und deshalb 1-gh darstellen muß (Figs. 2k, 3c). Tatsächlich wies dieses Fragment eine N-terminale Sequenz auf, die Ähnlichkeiten zu KLH1-g (Tabelle I) zeigte. Zur weiteren Bestätigung wurde das HPLC-aufgereinigte Fragment 1-gh mit Elastase in seine Bestandteil-FU's gespalten, aus denen 1-g aufgereinigt und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert wurde. Es wurde durch "crossed-line" IE-Verfahren seinem Gipfel in dem Elastase-Spaltmuster zugeordnet (Fig. 2l).

Das 220 kDa-Fragment aus der V8-Protease-Spaltung (Fig. 2e, f) wurde HPLC-aufgereinigt (Fig. 3b) und fusionierte im "crossed-line" IE-Verfahren mit 1-h, 1-g und drei noch nicht identifizierten Gipfeln des Elastase-Spaltmusters. Weiterhin wurde das 185 kDa-Fragment in ausreichender Reinheit erhalten (Fig. 2e, f; 3b), und es wurde gezeigt, dass sie die gleichen Komponenten mit Ausnahme von 1-h enthielten. Dies legte nahe, dass das 22 kDa und das 185 kDa-Fragment 1-defgh bzw. 1-defg sind. Tatsächlich war die N-terminale Sequenz praktisch identisch und zeigte weiterhin Ähnlichkeit zu KLH1-d (Tabelle I). Die Spal-

tung der HtH1-Untereinheit mit Trypsin ergab eine Vielzahl an Komponenten in dem Molekulargewichtsbereich von ein bzw. zwei FU's (Fig. 2m). Mehrere der Komponenten wurden in HPLC-Fractionen angereichert (Fig. 3d). Ein 100 kDa-Fragment erwies sich als besonders nützlich, da es die gleich N-terminale Sequenz wie das Fragment 1-defg aus der V8-Protease-Spaltung aufwies (Tabelle I); deshalb sollte das 100 kDa-Fragment 1-de darstellen. In dem "crossed-lined" IE-Verfahren fusionierte diese Komponente mit zwei der drei noch nicht identifizierten FU-Gipfeln des Elastase-Spaltmusters (Fig. 2n), welches deshalb 1-d und 1-e darstellen sollte, und somit eine einzige Möglichkeit für 1-f übrig ließ. Das "crossed-line" IE-Verfahren zeigte auch, dass in der 1-de Fraktion weiterhin FU 1-f vorhanden war (Fig. 2n). Die Identifikation von 1-f bestätigte durch Spaltung der Untereinheit mit Chymotrypsin (Fig. 2o) und nachfolgendem HPLC-Verfahren (Fig. 3e). Diese Spaltung ergab unter anderem ein 95 kDa-Fragment (2 FU's) welches im "crossed-line"-IE-Verfahren mit 1-g und einem zweiten Gipfel (Fig. 2p) fusionierte und deshalb entweder 1-gh (welches ausgeschlossen werden konnte, da 1-h bereits identifiziert war), oder 1-fg (welches sinnvoll erscheint aufgrund des weiteren betreffenden Peaks, der zu dem verbleibenden Kandidaten identisch war) sein könnte. Tatsächlich zeigte dieses Fragment eine neue N-terminale Sequenz, welche in gewisser Weise zu KLH1-f ähnlich ist (Tabelle I). Das letzte Problem bestand nun darin, die zwei verbleibenden FU-Gipfel 1-d bzw. 1-e zuzuordnen. Dies wurde unter Verwendung von HPLC-isolierten FU's aus Proben gelöst, in denen die Untereinheit mit Elastase gespalten worden war. (Fig. 2c, d; 3a). Die saurere Komponente in dem gekreuzten IE-Verfahren war 1-d abgeleitet aus seiner N-terminalen Sequenz, welche identisch ist mit der von 1-defgh (Fig. 2c; Tabelle I), wohingegen die basischere Komponente des 1-d/1-g-Paares eine neue N-terminale Sequenz (Tabelle I) aufwies und deshalb 1-e (Fig. 2a) sein mußte. Somit war die Struktur der funktionellen Einheiten der Untereinheit HtH1 aufgeklärt.

Beispiel 3:

Vergleich der Molekulargewichte und N-terminalen Sequenzen der biochemisch isolierten funktionellen Einheiten (FU's) aus HtH1 und KLH1. Die unterschiedlichen FU's, jede mit einer intakten binukleären Kupfer-Bindungsstelle, wurden durch limitierte Proteolyse als globuläre Segmente aus ihrer größeren Einheit freigesetzt; vgl. Abschnitt "Isolierung und Analyse der Einheiten aus HtH1". Die KLH1-Daten wurden aus Söhngen et al., supra, entnommen. Die Zuordnung als tatsächliche Einheit erfolgte aufgrund des Molekulargewichtes und des immunologischen Verhaltens (vgl. Fig. 2). Das ungewöhnlich niedrige Molekular-

gewicht von isoliertem HtH1-d könnte bedeuten, dass ein großes Peptid C-terminal abgespalten wurde.

TABELLE I

Funktionelle Einheit	Masse (kDa)	N-terminale Sequenz
HtH1-a	53	DNVVRKDVSHLTDDEVQ
KLH1-a	50	ENLVRKDVERL
HtH1-b	48	?
KLH1-b	45	?
HtH1-c	46	FEDEKHSRLRKNVDSLTP EENTNERLR
KLH1-c	45	KVPR SRLIRKNVDRLTPSE
HtH1-d	40	VEEVTGASHIRKNLNDLNTGEM
KLH1-d	50	EVT SANRIRKNIENLS
HtH1-e	49	ILDHDHEEEILVRKNIIDLSP
KLH1-e	50	?
HtH1-f	50	KLNSRKHTPNRVRHELSSLSSRDIASLKA
KLH1-f	45	HHLSXNKVRHDLSTL
HtH1-g	45	DHQSGSIAGSGVRKDVNTLTKAETDNLRE
KLH1-g	45	SSMAGHFVRKDINTLTP
HtH1-h	55	DEHHDDLADVLIRKEVDFLSLQEANAIKD
KLH1-h	60	HEDHHEDILVRKNIHSL

Beispiel 4:

Klonierung von Hämocyanin-cDNA

1. Zur Klonierung der cDNA von Hämocyanin wurde mRNA aus dem Mantelgewebe des jeweiligen Mollusken isoliert. Der erste cDNA-Strang wurde durch reverse Transkription mit Oligo(dT) als Primer erhalten. Der zweite Strang wurde durch konventionelle Synthese mit random Primern erhalten. Die so erhaltene cDNA wurde in einen Lambda-Expressionsvektor kloniert unter Bildung einer cDNA-Expressionsbibliothek. Unter Verwendung eines anti-Hämocyanin-Antikörpers wurde die Bibliothek unter geeigneten Bedingungen abgesucht, wobei positive Klone erhalten wurden. Diese positiven Klone wurden isoliert, sequenziert und charakterisiert.

2. Aus dem N-terminalen Bereich eines erhaltenen positiven Klons wurde eine cDNA-Sonde hergestellt, mit der die cDNA-Bibliothek abgesucht wurde. Die erhaltenen positiven Klone werden wiederum isoliert, sequenziert und charakterisiert.
3. Um noch weiter 5' gelegene Sequenzen zu erhalten, wurde eine weitere Expressionsbibliothek aus cDNA hergestellt, die mit Hilfe einer Kombination von Hämocyanin-spezifischen und „random“-Primern erhalten wurde. Diese cDNA-Bibliothek wurde mit cDNA-Sonden, die den „N-terminalen“ Bereichen der unter (2.) erhaltenen positiven Klone entsprechen, abgesucht. Die erhaltenen positiven Klone wurden isoliert, sequenziert und charakterisiert.

Beispiel 5:**Klonierung von Hämocyanin-Genen**

Genomische DNA wurde gemäß Standardverfahren isoliert. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe von Hämocyanin-spezifischen Primern durchgeführt, um die Genabschnitte der interessierenden Hämocyanine zu amplifizieren. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden in einen geeigneten Vektor (beispielsweise pGem T oder pGem T easy (Promega, Mannheim) kloniert, sequenziert und charakterisiert.

Beispiel 6:**Rekombinante Expression von Hämocyanin**

Mit einem cDNA-Klon, der die kodierende Sequenz für HtH-1d enthält, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, um spezifisch die kodierende Sequenz der Domäne 1d zu amplifizieren. Als Primer wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet.

Primer 1 (stromaufwärts) umfasst sechs Nukleotide des Endes der Domäne HtH-1c, eine SacI-Schnittstelle und 12 Nukleotide des Endes der Domäne HtH-1d.

Primer 2 (stromabwärts) umfasst sechs Nukleotide des Anfangs der Domäne HtH1-e, eine SalI-Schnittstelle und eine HtH1-d spezifische Sequenz.

PCR-Bedingungen:

2	min	95°C
30	sec	95°C
30	sec	55°C
1	min	72°C
35	Zyklen	
10	min	72°C

Das Amplifikat wurde in dem pGEM T easy PCR Klonierungsvektor (Promega) in XL-1 Blue (Stratagene) kloniert. Nach Isolation des rekombinanten Plasmids und Restriktion mit *SacI* und *SalI* konnte die cDNA der Domäne 1d isoliert werden. Der Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) wurde ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen restringiert.

Anschließend wurde die Ligation zwischen der Hth-1d-cDNA (restringiert mit *SacI* und *SalI*) und pQE (restringiert mit *SacI* und *SalI*) durchgeführt. Somit ist eine gerichtete Klonierung der cDNA, kodierend für Hth-1d, in einen Expressionsvektor möglich. Die Expression von Hth1-d in pQE in XL-1 Blue erfolgt gemäß Herstelleranleitung. Die Expression weiterer Hth1-, Hth2- oder KLH1- oder KLH2-Domänen kann analog erfolgen.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz und mindestens eine Intronsequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus:

- (a) Nukleinsäuresequenzen, die aus der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen ausgewählt sind oder diese enthalten:

SEQ ID NO:1 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),

SEQ ID NO:2 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:3 (HtH1 Domäne c),

SEQ ID NO:4 (HtH1 Domäne d),

SEQ ID NO:5 (HtH1 Domäne e),

SEQ ID NO:6 (HtH1 Domäne f),

SEQ ID NO:7 (HtH1 Domäne g),

SEQ ID NO: 8 (HtH1 Domäne h),

SEQ ID NO:9 (partielle HtH2 Domäne b),

SEQ ID NO:10 (HtH2 Domäne c),

SEQ ID NO:11 (HtH2 Domäne d),

SEQ ID NO:12 (HtH2 Domäne e),

SEQ ID NO:13 (HtH2 Domäne f),

SEQ ID NO:14 (HtH2 Domäne g),

SEQ ID NO:15 (HtH2 Domäne h),

SEQ ID NO:16 (partielle KLH1 Domäne b),

SEQ ID NO:17 (KLH1 Domäne c),

SEQ ID NO:18 (KLH1 Domäne d),

SEQ ID NO:19 (partielle KLH1 Domäne e),

SEQ ID NO:20 (KLH2 Domäne b),

SEQ ID NO:21 (KLH2 Domäne c),

SEQ ID NO:22 (partielle KLH2 Domäne d),

SEQ ID NO:23 (KLH2 Domäne g),

SEQ ID NO:24 (partielle KLH2 Domäne h),
SEQ ID NO:49 (HtH1 Domäne a' + Signalpeptid),
SEQ ID NO:50 (partielle HtH2 Domäne a),
SEQ ID NO:51 (HtH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:52 (HtH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:53 (HtH2 Domäne e'),
SEQ ID NO:54 (KLH1 Domäne e'),
SEQ ID NO:55 (KLH1 Domäne f),
SEQ ID NO:56 (KLH1 Domäne g),
SEQ ID NO:57 (KLH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:58 (KLH2 Domäne c'),
SEQ ID NO:59 (KLH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:60 (KLH2 Domäne e),
SEQ ID NO:61 (KLH2 Domäne f),
SEQ ID NO:62 (KLH2 Domäne g'),
SEQ ID NO:80 (HtH1 Domäne a" + Signalpeptid),
SEQ ID NO:81 (HtH1 Domäne b"),
SEQ ID NO:82 (HtH1 Domäne c"),
SEQ ID NO:83 (HtH1 Domäne d"),
SEQ ID NO:84 (HtH1 Domäne e"),
SEQ ID NO:85 (HtH1 Domäne f"),
SEQ ID NO:86 (HtH1 Domäne g"),
SEQ ID NO:87 (HtH1 Domäne h"),
SEQ ID NO:88 (partielle HtH2 Domäne a"),
SEQ ID NO:89 (HtH2 Domäne b")
SEQ ID NO:90 (HtH2 Domäne c"),
SEQ ID NO:91 (HtH2 Domäne d"),
SEQ ID NO:92 (HtH2 Domäne e"),
SEQ ID NO:93 (HtH2 Domäne f"),
SEQ ID NO:94 (HtH2 Domäne g"),
SEQ ID NO:95 (HtH2 Domäne h"),
SEQ ID NO:96 (partielle KLH1 Domäne b"),
SEQ ID NO:97 (KLH1 Domäne c"),
SEQ ID NO:98 (KLH1 Domäne d"),

SEQ ID NO:99 (KLH1 Domäne e"),
SEQ ID NO:100 (KLH1 Domäne f"),
SEQ ID NO:101 (KLH1 Domäne g"),
SEQ ID NO:102 (KLH2 Domäne b"),
SEQ ID NO:103 (KLH2 Domäne c"),
SEQ ID NO:104 (KLH2 Domäne d"),
SEQ ID NO:105 (KLH2 Domäne e"),
SEQ ID NO:106 (KLH2 Domäne f"),
SEQ ID NO:107 (KLH2 Domäne g"),
SEQ ID NO:108 (partielle KLH2 Domäne h"),
SEQ ID NO:157 (vollständige HtH2 Domäne a);

- (b) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (a) hybridisieren und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (c) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert sind und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (d) Nukleinsäuresequenzen, die mit einer der unter (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und deren Gegenstrang für ein Polypeptid kodiert, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (e) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (f) Varianten der unter (a) bis (d) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten gegenüber den unter (a) bis (d) angegebenen Sequenzen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist; und
- (g) Kombinationen mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen.

2. Nukleinsäure-Molekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Intron-sequenz ausgewählt ist aus:

- (i) Nukleinsäuresequenzen, die aus der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen ausgewählt sind oder diese enthalten:

SEQ ID NO:109 (Intron 1S-1/1S-2 von Hth1),
SEQ ID NO:110 (Intron 1S-2/1A-1 von Hth1),
SEQ ID NO:111 (Intron 1A-1/1A-2 von Hth1),
SEQ ID NO:112 (Intron 1A-2/1A-3 von Hth1),
SEQ ID NO:113 (Intron 1A-3/1A-4 von Hth1),
SEQ ID NO:114 (Intron 1A-4/1B von Hth1),
SEQ ID NO:115 (Intron 1B/1C von Hth1),
SEQ ID NO:116 (Intron 1C/1D von Hth1),
SEQ ID NO:117 (Intron 1D/1E von Hth1),
SEQ ID NO:118 (Intron 1E/1F-1 von Hth1),
SEQ ID NO:119 (Intron 1F-1/1F-2 von Hth1),
SEQ ID NO:120 (Intron 1F-2/1G-1 von Hth1),
SEQ ID NO:121 (Intron 1F-1/1G-2 von Hth1),
SEQ ID NO:122 (Intron 1G-2/1G-3 von Hth1),
SEQ ID NO:123 (Intron 1G-3/1H von Hth1),
SEQ ID NO:124 (Intron in dem 3'UTR-Bereich von Hth1),
SEQ ID NO:125 (Intron 2A-1/2A-2 von Hth2),
SEQ ID NO:126 (Intron 2A-1/2A-3 von Hth2),
SEQ ID NO:127 (Intron 2A-1/2A-4 von Hth2),
SEQ ID NO:128 (Intron 2A-4/2B von Hth2),
SEQ ID NO:129 (Intron 2B/2C von Hth2),
SEQ ID NO:130 (Intron 2C/2D von Hth2),
SEQ ID NO:131 (Intron 2D/2E von Hth2),
SEQ ID NO:132 (Intron 2E/2F-1 von Hth2),
SEQ ID NO:133 (Intron 2F-1/2F-2 von Hth2),
SEQ ID NO:134 (Intron 2F-2/2GF-1 von Hth2),

SEQ ID NO:135 (Intron 2G-1/2G-2 von HtH2),
SEQ ID NO:136 (Intron 2G-2/2G-3 von HtH2),
SEQ ID NO:137 (Intron 2G-3/2H von HtH2),
SEQ ID NO:138 (Intron in dem 3'UTR-Bereich von HtH2),
SEQ ID NO:139 (Intron 1B/1C von KLH1),
SEQ ID NO:140 (Intron 1C/1D von KLH1),
SEQ ID NO:141 (Intron 1D/1E von KLH1),
SEQ ID NO:142 (Intron 1E/1F von KLH1),
SEQ ID NO:143 (Intron 1F-1/1F-2 von KLH1),
SEQ ID NO:144 (Intron 1F-2/1G-1 von KLH1),
SEQ ID NO:145 (Intron 1G-1/1G-2 von KLH1),
SEQ ID NO:146 (Intron 1G-2/1G-3 von KLH1),
SEQ ID NO:147 (Intron 2B/2C von KLH2),
SEQ ID NO:148 (Intron 2C/2D von KLH2),
SEQ ID NO:149 (Intron 2D/2E von KLH2),
SEQ ID NO:150 (Intron 2E/2F von KLH2),
SEQ ID NO:151 (Intron 2F von KLH2),
SEQ ID NO:152 (Intron 2F-2/2G von KLH2),
SEQ ID NO:153 (Intron 2G-1/2G-2 von KLH2),
SEQ ID NO:154 (Intron 2G-2/2G-3 von KLH2),
SEQ ID NO:155 (Intron 2G/2H von KLH2);

- (ii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (i) hybridisieren;
- (iii) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (i) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (iv) Varianten der unter (i) bis (iii) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten gegenüber den unter (i) unter (iii) angegebenen Sequenzen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen; und
- (v) Kombinationen mehrerer der unter (i) bis (iv) angegebenen DNA-Sequenzen.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die unter (b) oder (d) bzw. unter (ii) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird.
4. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 80 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.
5. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.
6. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 95 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.
7. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das unter (iii) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 80 % homolog zu einer der unter (i) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.
8. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das unter (iii) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (i) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.
9. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das unter (iii) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 95 % homolog zu einer der unter (i) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.
10. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass es ein Desoxyribonukleinsäuremolekül ist.
11. Konstrukt, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.
12. Konstrukt gemäß Anspruch 11, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.

13. Konstrukt gemäß Anspruch 11 oder 12, weiterhin umfassend eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz, die direkt mit der für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon kodierenden Nukleinsäuresequenz verbunden ist.

14. Konstrukt gemäß Anspruch 13, wobei das Antigen ausgewählt ist aus: Tumorantigenen, Virusantigenen und Antigenen bakterieller oder parasitärer Pathogene.

15. Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei das Konstrukt wenigstens einen Teil eines Vektors enthält, wobei der Vektor ausgewählt ist aus: Bakteriophagen, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Virus und Retroviren.

16. Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei das Konstrukt weiterhin eine His-Tag-kodierende Nukleinsäuresequenz umfasst und die Expression des Konstrukts zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag führt.

17. Wirtszelle, enthaltend ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Konstrukts geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.

18. Wirtszelle gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die prokaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus E. coli und Bacillus subtilis.

19. Wirtszelle gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die eukaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, bevorzugt aus CHO-Zellen, COS-Zellen und HeLa-Zellen.

20. Verfahren zum Herstellen eines Hämocyanin-Polypeptides, wobei das Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder das Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird und das Protein gegebenenfalls isoliert wird.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass das hergestellte Hämocyanin-Polypeptid natürlich oder chemisch modifiziert wird.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Modifikation eine Quervernetzung oder eine kovalente Bindung an ein Antigen ist.

23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Expression in einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19 durchgeführt wird.

24. Hämocyanin-Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die von einem oder mehreren der Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 10 kodiert wird.

25. Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 24, umfassend wenigstens eine aus der folgenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz:

SEQ ID NO:25 (HtH1 Domäne a + Signalpeptid),

SEQ ID NO:26 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:27 (HtH1 Domäne c),

SEQ ID NO:28 (HtH1 Domäne d),

SEQ ID NO:29 (HtH1 Domäne e),

SEQ ID NO:30 (HtH1 Domäne f),

SEQ ID NO:31 (HtH1 Domäne g),

SEQ ID NO:32 (HtH1 Domäne h),

SEQ ID NO:33 (partielle HtH2 Domäne b),

SEQ ID NO:34 (HtH2 Domäne c),

SEQ ID NO:35 (HtH2 Domäne d),

SEQ ID NO:36 (HtH2 Domäne e),

SEQ ID NO:37 (HtH2 Domäne f),

SEQ ID NO:38 (HtH2 Domäne g),

SEQ ID NO:39 (HtH2 Domäne h),

SEQ ID NO:40 (partielle KLH1 Domäne b),

SEQ ID NO:41 (KLH1 Domäne c),

SEQ ID NO:42 (partielle KLH1 Domäne d),

SEQ ID NO:43 (partielle KLH1 Domäne e),

SEQ ID NO:44 (KLH2 Domäne b),

SEQ ID NO:45 (KLH2 Domäne c),

SEQ ID NO:46 (partielle KLH2 Domäne d),

SEQ ID NO:47 (KLH2 Domäne g),

SEQ ID NO:48 (partielle KLH2 Domäne h),
SEQ ID NO:63 (Hth1 Domäne a' + Signalpeptid),
SEQ ID NO:64 (Hth1 Domäne h'),
SEQ ID NO:65 (partielle Hth2 Domäne a),
SEQ ID NO:156 (vollständige Hth2 Domäne a),
SEQ ID NO:66 (Hth2 Domäne b'),
SEQ ID NO:67 (Hth2 Domäne d'),
SEQ ID NO:68 (Hth2 Domäne e'),
SEQ ID NO:69 (partielle KLH1 Domäne b'),
SEQ ID NO:70 (KLH1 Domäne e'),
SEQ ID NO:71 (KLH1 Domäne f),
SEQ ID NO:72 (KLH1 Domäne g),
SEQ ID NO:73 (KLH1 Domäne h),
SEQ ID NO:74 (KLH2 Domäne b'),
SEQ ID NO:75 (KLH2 Domäne c'),
SEQ ID NO:76 (KLH2 Domäne d'),
SEQ ID NO:77 (KLH2 Domäne e),
SEQ ID NO:78 (KLH2 Domäne f),
SEQ ID NO:79 (KLH2 Domäne g'),
SEQ ID NO:158 (teilweise KLH2 Domäne h)

oder ein Fragment einer dieser Sequenzen, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist.

26. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23 oder Modifikationen davon.

27. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass es die Sequenzen SEQ ID NO: 25 bis 32 umfasst und Hämocyanin 1 aus *Haliotis tuberculata* ist, wobei die Sequenz mit SEQ ID NO:25 durch SEQ ID NO:63 und/oder SEQ ID NO:32 durch SEQ ID NO:64 ersetzt sein kann.

28. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass es entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 33 bis 39 oder die Sequenzen SEQ ID NO:65, 66, 34-39 umfasst und Hämocyanin 2 aus *Haliotis tuberculata* ist, wobei jeweils

SEQ ID NO:35 durch SEQ ID NO:67 und/oder SEQ ID NO:36 durch SEQ ID NO:68 ersetzt sein kann.

29. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, dass es ein scheinbares Molekulargewicht von 370 KDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist.

30. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, dass es ein scheinbares Molekulargewicht von 370 KDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist.

31. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Hämocyanin-Polypeptid entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 40 bis 43 oder die Sequenzen SEQ ID NO:40 bis 43 und SEQ ID NO:71 bis 73 umfasst und KLH1 aus *Megathura crenulata* ist, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:40 durch SEQ ID NO:66 und/oder SEQ ID NO:43 durch SEQ ID NO:70 ersetzt sein kann.

32. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Hämocyanin-Polypeptid entweder die Sequenzen SEQ ID NO: 44 bis 48 oder die Sequenzen SEQ ID NO:44 bis 46, 77, 78, 47, 48 umfasst und KLH2 aus *Megathura crenulata* ist, wobei jeweils die Sequenz mit SEQ ID NO:44 durch SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:45 durch SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:46 durch SEQ ID NO:76 und/oder SEQ ID NO:47 durch SEQ ID NO:79 ersetzt sein kann.

33. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 24 bis 32, **dadurch gekennzeichnet**, dass es kovalent an Viren, Virenbestandteile, Bakterien, Bakterienbestandteile, DNA, DNA-Bestandteile, anorganische oder organische Moleküle wie z. B. Kohlenhydrate Peptide und/oder Glykoproteine gebunden ist.

34. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 24 bis 33, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Hämocyanin-Polypeptid nicht-glykosyliert ist.

35. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 24 bis 33, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Hämocyanin-Polypeptid glykosyliert ist.

36. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16 und physiologisch verträgliche Zusatzmittel.
37. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 36, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie zur gentherapeutischen Behandlung von Tumoren verwendet wird.
38. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Hämocyanin-Polypeptid nach einem der Ansprüche 24 bis 35 und physiologisch verträgliche Zusatzmittel.
39. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie als Antiparasitenmittel, Antivirusmittel oder als Antitumormittel verwendet wird.
40. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie zum Behandeln einer der folgenden Erkrankungen verwendet wird: Schistosomiasis, Bluthochdruck, Oberflächen-Harnblasenkarzinomen, Epithelkarzinomen, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Kolonrektalkarzinom.
41. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie als Impfstoff verwendet wird.
42. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 38, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie zur Kokain-Mißbrauchsvorsorge verwendet wird.
43. Verwendung von Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 24 bis 35 als Trägerstoff für Arzneimittel.
44. Liposom, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16 und/oder ein Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 24 bis 35.
45. Liposom gemäß Anspruch 44, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Liposom weiterhin Zellerkennungsmoleküle umfasst.
46. Antikörper, erhältlich durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem rekombinanten Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 24 bis 35.

47. Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumor-spezifischer DNA in einer Zelle umfassend:

- a) das Inkontaktbringen zellulärer DNA und/oder zellulären Proteins mit einer Sonde umfassend die Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 und/oder des Antikörpers gemäß Anspruch 46 und
- b) das Nachweisen der spezifischen Bindung.

48. Screening-Verfahren gemäß Anspruch 47, **dadurch gekennzeichnet**, dass der nachzuweisende Tumor Harnblasenkarzinom, Epithelialkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Kolonrektalkarzinom ist.

12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14536 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/00.
A61K 39/00, C12N 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08129

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. August 2000 (21.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 39 578.0 20. August 1999 (20.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]:
Schornfelder Str. 32, D-70734 Fellbach (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MARKL, Jürgen
[DE/DE]; An der Mahlstieg 12, D-55296 Gau-Bischof-
sheim (DE). ALTENHEIN, Benjamin [DE/DE]; Elsässer
Platz 7, D-65195 Wiesbaden (DE). LIEB, Bernhard
[DE/DE]; Konrad-Adenauer-Str. 27, D-55129 Mainz
(DE). STIEFEL, Thomas [DE/DE]; Steinkopfst. 22,
D-70184 Stuttgart (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINDELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstr. 58, D-80538
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE COMPRISING A NUCLEIC ACID SEQUENCE WHICH CODES FOR A HAEMO-
CYANIN, AND COMPRISING AT LEAST ONE INTRON SEQUENCE

(54) Bezeichnung: NUKLEINSÄUREMOLEKÜL, UMFASSEND EINE FÜR EIN HÄMOCYANIN KODIERENDE NUKLEIN-
SÄURESEQUENZ UND MINDESTENS EINE INTRONSEQUENZ

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid molecule which comprises a nucleic acid sequence that codes for a haemo-
cyanin, a haemocyanin domain or a fragment with the immunological properties of at least one domain of haemocyanin, and which
comprises at least one intron sequence. The invention also relates to constructs which contain the nucleic acid molecule and which,
optionally, contain a promoter suited for controlling expression. In a preferred embodiment, the construct also contains a nucleic
acid sequence which codes for an antigen. The invention also relates to host cells containing these nucleic acid molecules and/or
constructs, to the recombinant expression of the nucleic acid molecules and/or constructs in the host cells, to haemocyanin, a haemo-
cyanin domain, a fragment with the immunological properties of at least one domain of haemocyanin, and to haemocyanin fusion
proteins that are coded by the nucleic acid molecules and/or by the constructs. The invention additionally relates to pharmaceutical
compositions which contain the nucleic acid molecules and/or haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion
protein, and to liposomes containing the nucleic acid molecules and/or haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment thereof or
a fusion protein. Finally, the invention also relates to antibodies which can be obtained by immunizing an experimental animal with
the haemocyanin, a haemocyanin domain, a fragment thereof or a fusion protein, and to the use thereof in screening methods for
identifying tumors.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine
Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodie-
rende Nukleinsäuresequenz und mindestens eine Intronsequenz. Weiterhin betrifft die Erfindung Konstrukte, die das Nukleinsäure-
molekül und gegebenenfalls einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform
enthält das Konstrukt ferner eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz. Die Erfindung betrifft ausserdem Wirtszellen, die
diese Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die rekombinante Expression der Nukle-
insäuremoleküle und/oder Konstrukte in den Wirtszellen. Weiterhin betrifft die Erfindung Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne,
ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin und Hämocyanin-Fusionsprote-
ine, die von den Nukleinsäuremolekülen und/oder Konstrukten kodiert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische
Zusammensetzungen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder
ein Fusionsprotein, enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung Liposomen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin,
eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die
durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem Hämocyanin, einer Hämocyanin-Domäne, einem Fragment davon oder einem
Fusionsprotein, erhältlich sind, und deren Verwendung in Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumoren.

WO 01/14536 A3



MZ. NO. NZ. PL. PT. RO. RU. SD. SE. SG. SI. SK. SL.
TJ. TM. TR. TT. TZ. UA. UG. US. UZ. VN. YU. ZA. ZW.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

27. Juni 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/00 A61K39/00 C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 621 039 A (AKZO NOBEL NV) 26 October 1994 (1994-10-26) the whole document ---	1-48
A	EP 0 252 829 A (PASTEUR INSTITUT ; PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED () 13 January 1988 (1988-01-13) the whole document ---	1-48
X	US 5 888 775 A (CHAVAILLAZ PIERRE-ANDRE ET AL.) 30 March 1999 (1999-03-30) abstract column 8, line 45 - line 59 ---	1-48
A	EP 0 244 295 A (PASTEUR INSTITUT ; PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED () 4 November 1987 (1987-11-04) the whole document ---	1-48

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2002

Date of mailing of the international search report

25.03.02

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/08129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 11019 A (ZONAGEN INC) 26 May 1994 (1994-05-26) the whole document ---	1-48
X	US 5 831 033 A (BAO LERE ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 7, line 56 -column 17, line 47 ---	1-48
X	SWERDLOW RICHARD D ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B, vol. 113, no. 3, 1996, pages 537-548, XP000900921 ISSN: 0305-0491 the whole document ---	1-48
A	HAMILTON J V ET AL: "Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic Schistosoma mansoni egg antigens." PARASITOLOGY, vol. 118, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 83-89, XP000912289 ISSN: 0031-1820 the whole document ---	1-44
A	MILLER KAREN I ET AL: "Sequence of the Octopus dofleini hemocyanin subunit: Structural and evolutionary implications." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 278, no. 4, 15 May 1998 (1998-05-15), pages 827-842, XP002164204 ISSN: 0022-2836 the whole document ---	1-48
X,P	STOEVA STANKA ET AL: "Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1435, no. 1-2, 16 November 1999 (1999-11-16), pages 94-109, XP000937695 ISSN: 0006-3002 the whole document in particular Paragraph 2.6, 3.1, table 1, figures 1, 3. --- -/--	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>GEBAUER WOLFGANG ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): Detection and immunolocalization of a labile functional unit h."</p> <p>JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY., vol. 128, no. 3, 30 December 1999 (1999-12-30), pages 280-286, XP000937601</p> <p>ISSN: 1047-8477</p> <p>the whole document</p> <p>in particular table 1.</p>	1-48
A	<p>HARRIS J ROBIN ET AL: "Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (Megathura crenulata): A parallel subunit model."</p> <p>JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 111, no. 2, 1993, pages 96-104, XP000900919</p> <p>ISSN: 1047-8477</p> <p>the whole document</p>	1-48
T	<p>CARRERA M ROCIO A ET AL: "Cocaine vaccines: Antibody protection against relapse in a rat model."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 11, 23 May 2000 (2000-05-23), pages 6202-6206, XP002148844</p> <p>May 23, 2000</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>the whole document</p>	38-42
X	<p>SOEHNGEN SABINE M ET AL: "Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH)."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 248, no. 2, 1997, pages 602-614, XP000912288</p> <p>ISSN: 0014-2956</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p>in particula table 3.</p>	1-48
X	<p>CARRERA M ROCIO A ET AL: "Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization."</p> <p>NATURE (LONDON), vol. 378, no. 6558, 1995, pages 727-730, XP000946580</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>the whole document</p>	38-42

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/08129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	LIEB BERNHARD ET AL: "The sequence of a gastropod hemocyanin (Hth1 from Haliotis tuberculata)." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 8, 25 February 2000 (2000-02-25), pages 5675-5681, XP000946778 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	1-48
X,P	LIEB BERNHARD ET AL: "Subunit organization of the abalone Haliotis tuberculata hemocyanin type 2 (Hth2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 265, no. 1, October 1999 (1999-10), pages 134-144, XP000952187 ISSN: 0014-2956 the whole document ---	1-48
X	KELLER HENNING ET AL: "Abalone (Haliotis tuberculata) hemocyanin type 1 (Hth1): Organization of the approx 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 264, no. 1, August 1999 (1999-08), pages 27-38, XP000952186 ISSN: 0014-2956 the whole document ---	1-48
A	DREXEL R ET AL: "COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF A FUNCTIONAL UNIT FROM A MOLLUSCAN HEMOCYANIN HELIX-POMATIA" BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, vol. 368, no. 6, 1987, pages 617-636, XP000997484 ISSN: 0177-3593 the whole document ---	1-48
T	LIEB BERNHARD ET AL: "Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 8, 10 April 2001 (2001-04-10), pages 4546-4551, XP002190023 April 10, 2001 ISSN: 0027-8424 -----	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/08129

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos. because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

Due to the findings of the preliminary examination, no additional fees are to be refunded in accordance with PCT Rule 40.2(e).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

Claims Nos. 1-48 (in part, with regard to groups 1, 3, 7 and 8 as defined on Form 210)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

Additional matter PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-48 (in part)

Hemocyanin domain from *Haliotis tuberculata*, Hth1 or a functional fragment thereof with the immunological properties of at least one domain of a hemocyanin Hth1, the polypeptide sequence thereof that is selected from Seq. ID Nos. 25-32 of the sequence index; coding nucleic acid sequences Seq. ID Nos. 1-8 thereof, and at least one intron sequence selected from Seq. ID Nos. 109-155. Use of the above-mentioned sequences in the production of pharmaceutical compositions, and their applications in therapeutic treatments against tumor-related illnesses, infections, and pathologies resulting from cocaine abuse.

2. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin Hth2 from *Haliotis tuberculata* with amino acid sequences (aa) and their coding nucleic acid sequences (DNA), each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 33-39 (aa) and 9-15 (DNA).

3. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin KLH1 from *Megathura crenulata* with amino acid sequences (aa) and their coding nucleic acid sequences (DNA), each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 40-43 (aa) and 16-19 (DNA).

4. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin KLH2 from *Megathura crenulata* with amino acid sequences (aa) and their coding nucleic acid sequences (DNA), each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 44-48 (aa) and 20-24 (DNA).

5. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin Hth1 from *Haliotis tuberculata* with amino acid sequences (aa) and their coding nucleic acid sequences (DNA), each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 63, 64 (aa) and 49 (DNA).

Additional matter PCT/ISA/210

6. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin Hth2 from *Haliotis tuberculata* with amino acid sequences and their coding nucleic acid sequences, each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 65-68 and 156 (aa) and 50-53 (DNA).

7. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin KLH1 from *Megathura crenulata* with amino acid sequences and their coding nucleic acid sequences, each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 69-73 (aa) and 54-56, 96-101 (DNA).

8. Claims Nos. 1-48 (in part)

As in Invention No. 1, with regard to hemocyanin KLH2 from *Megathura crenulata* with amino acid sequences (aa) and their coding nucleic acid sequences (DNA), each comprising a sequence selected from Seq. ID Nos. 74-79 and 158 (aa), and 57-62, 102-108 (DNA).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08129

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0621039	A	26-10-1994	US 5407912 A AU 681872 B2 AU 6051994 A CA 2121296 A1 EP 0621039 A1 FI 941725 A JP 7101875 A US 5981476 A US 5855919 A	18-04-1995 11-09-1997 20-10-1994 20-10-1994 26-10-1994 20-10-1994 18-04-1995 09-11-1999 05-01-1999
EP 0252829	A	13-01-1988	FR 2601021 A2 AU 7528087 A DK 347987 A EP 0252829 A1 JP 1139533 A OA 8630 A PT 85278 A ,B US 5021560 A ZA 8704920 A	08-01-1988 08-12-1988 08-01-1988 13-01-1988 01-06-1989 30-11-1988 01-08-1987 04-06-1991 27-04-1988
US 5888775	A	30-03-1999	AT 171217 T AU 696349 B2 AU 2371195 A CA 2165413 A1 DE 69504795 D1 DE 69504795 T2 EP 0706574 A1 JP 8512210 T WO 9530016 A1 US 5763284 A	15-10-1998 10-09-1998 29-11-1995 30-10-1995 22-10-1998 12-05-1999 17-04-1996 24-12-1996 09-11-1995 09-06-1998
EP 0244295	A	04-11-1987	FR 2598147 A1 AU 7185387 A DE 244295 T1 DK 219787 A EP 0244295 A1 JP 63039888 A PT 84788 A ,B	06-11-1987 05-11-1987 13-10-1988 31-10-1987 04-11-1987 20-02-1988 01-05-1987
WO 9411019	A	26-05-1994	CN 1110177 A AU 675269 B2 AU 5680094 A CA 2127531 A1 EP 0634936 A1 JP 7503142 T WO 9411019 A1 US 6027727 A US 6001599 A US 5989550 A US 5976545 A US 5981228 A US 5837497 A	18-10-1995 30-01-1997 08-06-1994 26-05-1994 25-01-1995 06-04-1995 26-05-1994 22-02-2000 14-12-1999 23-11-1999 02-11-1999 09-11-1999 17-11-1998
US 5831033	A	03-11-1998	US 5721337 A US 6017717 A US 6300479 B1	24-02-1998 25-01-2000 09-10-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08129

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/00 A61K39/00 C12N15/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 621 039 A (AKZO NOBEL NV) 26. Oktober 1994 (1994-10-26) das ganze Dokument	1-48
A	EP 0 252 829 A (PASTEUR INSTITUT ; PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED () 13. Januar 1988 (1988-01-13) das ganze Dokument	1-48
X	US 5 888 775 A (CHAVAILLAZ PIERRE-ANDRE ET AL) 30. März 1999 (1999-03-30) Zusammenfassung Spalte 8, Zeile 45 - Zeile 59	1-48
A	EP 0 244 295 A (PASTEUR INSTITUT ; PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED () 4. November 1987 (1987-11-04) das ganze Dokument	1-48
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgelieft)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Fähigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Februar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25 3 02

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Panzica, G

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der ...	ni kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 11019 A (ZONAGEN INC) 26. Mai 1994 (1994-05-26) das ganze Dokument ---		1-48
X	US 5 831 033 A (BAO LERE ET AL) 3. November 1998 (1998-11-03) Spalte 7, Zeile 56 -Spalte 17, Zeile 47 ---		1-48
X	SWERDLOW RICHARD D ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B, Bd. 113, Nr. 3, 1996, Seiten 537-548, XP000900921 ISSN: 0305-0491 das ganze Dokument ---		1-48
A	HAMILTON J V ET AL: "Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic Schistosoma mansoni egg antigens." PARASITOLOGY, Bd. 118, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), Seiten 83-89, XP000912289 ISSN: 0031-1820 das ganze Dokument ---		1-44
A	MILLER KAREN I ET AL: "Sequence of the Octopus dofleini hemocyanin subunit: Structural and evolutionary implications." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 278, Nr. 4, 15. Mai 1998 (1998-05-15), Seiten 827-842, XP002164204 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument ---		1-48
X,P	STOEVA STANKA ET AL: "Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1435, Nr. 1-2, 16. November 1999 (1999-11-16), Seiten 94-109, XP000937695 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument insbesondere Absätze 2.6, 3.1, Tabelle 1, Abbildungen 1, 3. ---		1-48
	---	---/---	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der m Betracht kommenden Teile	Beitrag Anspruch Nr.
X,P	<p>GEBAUER WOLFGANG ET AL: "Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): Detection and immunolocalization of a labile functional unit h."</p> <p>JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY., Bd. 128, Nr. 3, 30. Dezember 1999 (1999-12-30), Seiten 280-286, XP000937601</p> <p>ISSN: 1047-8477</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>insbesondere Tabelle 1.</p> <p>---</p>	1-48
A	<p>HARRIS J ROBIN ET AL: "Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (Megathura crenulata): A parallel subunit model."</p> <p>JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, Bd. 111, Nr. 2, 1993, Seiten 96-104, XP000900919</p> <p>ISSN: 1047-8477</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-48
T	<p>CARRERA M ROCIO A ET AL: "Cocaine vaccines: Antibody protection against relapse in a rat model."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 97, Nr. 11, 23. Mai 2000 (2000-05-23), Seiten 6202-6206, XP002148844</p> <p>May 23, 2000</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	38-42
X	<p>SOEHNGEN SABINE M ET AL: "Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH)."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 248, Nr. 2, 1997, Seiten 602-614, XP000912288</p> <p>ISSN: 0014-2956</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>Insbesondere Tab.3.</p> <p>---</p>	1-48
X	<p>CARRERA M ROCIO A ET AL: "Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization."</p> <p>NATURE (LONDON), Bd. 378, Nr. 6558, 1995, Seiten 727-730, XP000946580</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	38-42

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	LIEB BERNHARD ET AL: "The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from Haliotis tuberculata)." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 275, Nr. 8, 25. Februar 2000 (2000-02-25), Seiten 5675-5681, XP000946778 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	1-48
X,P	LIEB BERNHARD ET AL: "Subunit organization of the abalone Haliotis tuberculata hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units d, e, f, g and h." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 265, Nr. 1, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 134-144, XP000952187 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument ---	1-48
X	KELLER HENNING ET AL: "Abalone (Haliotis tuberculata) hemocyanin type 1 (HtH1): Organization of the approx 400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units f, g and h." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 1, August 1999 (1999-08), Seiten 27-38, XP000952186 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument ---	1-48
A	DREXEL R ET AL: "COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF A FUNCTIONAL UNIT FROM A MOLLUSCAN HEMOCYANIN HELIX-POMATIA" BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, Bd. 368, Nr. 6, 1987, Seiten 617-636, XP000997484 ISSN: 0177-3593 das ganze Dokument ---	1-48
T	LIEB BERNHARD ET AL: "Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 98, Nr. 8, 10. April 2001 (2001-04-10), Seiten 4546-4551, XP002190023 April 10, 2001 ISSN: 0027-8424 -----	1-48

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/08129

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
1-48 (teilweise, bezüglich Gruppen 1, 3, 7 und 8 wie auf Formular 210 definiert)
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Hämocyanin-Domäne aus *Haliotis tuberculata*, HtH1, oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften von wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins HtH1, deren Polypeptidsequenz die aus Seq.Id.Nr.25-32 des Sequenzverzeichnisses ausgewählt ist; deren kodierenden Nukleinsäuresequenzen Seq.Id.Nr.1-8, und mindestens eine Intronsequenz, die aus die Seq.Id.Nr. 109.-155 gewählt ist. Verwendung der obigen Sequenzen bei der Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, sowie deren Verwendungen in therapeutischen Behandlungen gegen geschwulstverwandten Krankheiten, Infektionen, Pathologien aus Kokain-Missbrauch.

2. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin HtH2 aus *Haliotis tuberculata*, mit Aminosäure- (aa) und deren codierenden Nukleinsäuresequenzen (DNA), umfassend jeweils eine von Seq.Id.Nr.33-39 (aa) und 9-15 (DNA) ausgewählte Sequenz.

3. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin KLH1 aus *Megathura crenulata*, mit Aminosäure- (aa) und deren codierenden Nukleinsäuresequenzen (DNA), umfassend jeweils eine von Seq.Id.Nr.40-43 (aa) und 16-19 (DNA) ausgewählte Sequenz.

4. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin KLH2 aus *Megathura crenulata*, mit Aminosäure- (aa) und deren codierenden Nukleinsäuresequenzen (DNA), Sequenzen, umfassend jeweils eine von Seq.Id.Nr. 44-48 (aa) und 20-24 (DNA) ausgewählte Sequenz.

5. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin HtH1 aus *Haliotis tuberculata*, mit Aminosäuresequenzen (aa) und deren codierenden Nukleinsäuresequenzen (DNA), umfassend jeweils eine von Seq.Id.Nr.63, 64 (aa) und 49 (DNA) ausgewählte Sequenz.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA 210

6. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin Hth2 aus *Haliotis tuberculata*, mit Aminosäuresequenzen und derencodierenden Nukleinsäuresequenzen, umfassend jeweils eine von Seq.Id.Nr. 65-68 und 156 (aa) und 50-53 (DNA) ausgewählte Sequenz.

7. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin KLH1 aus *Megathura crenulata*, mit Aminosäuresequenzen und derencodierenden Nukleinsäuresequenzen, umfassend jeweils eine von Seq.Id.Nr. 69-73 (aa) und 54-56, 96-101 (DNA) ausgewählte Sequenz.

8. Ansprüche: 1-48 (teilweise)

Ebensowie Erfindung 1, bezogen auf Hämocyanin KLH2 aus *Megathura crenulata*, mit Aminosäuresequenzen und derencodierenden Nukleinsäuresequenzen (aa) und Nukleinsäuresequenzen (DNA), umfassend eine von Seq.Id.Nr. 74-79 und 158 (aa), und 57-62, 102-108 (DNA) ausgewählte Sequenz.

INTERNATION. ER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungen

PCT/EP 00/08129

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0621039 A	26-10-1994	US 5407912 A	18-04-1995
		AU 681872 B2	11-09-1997
		AU 6051994 A	20-10-1994
		CA 2121296 A1	20-10-1994
		EP 0621039 A1	26-10-1994
		FI 941725 A	20-10-1994
		JP 7101875 A	18-04-1995
		US 5981476 A	09-11-1999
		US 5855919 A	05-01-1999
EP 0252829 A	13-01-1988	FR 2601021 A2	08-01-1988
		AU 7528087 A	08-12-1988
		DK 347987 A	08-01-1988
		EP 0252829 A1	13-01-1988
		JP 1139533 A	01-06-1989
		OA 8630 A	30-11-1988
		PT 85278 A ,B	01-08-1987
		US 5021560 A	04-06-1991
		ZA 8704920 A	27-04-1988
US 5888775 A	30-03-1999	AT 171217 T	15-10-1998
		AU 696349 B2	10-09-1998
		AU 2371195 A	29-11-1995
		CA 2165413 A1	30-10-1995
		DE 69504795 D1	22-10-1998
		DE 69504795 T2	12-05-1999
		EP 0706574 A1	17-04-1996
		JP 8512210 T	24-12-1996
		WO 9530016 A1	09-11-1995
EP 0244295 A	04-11-1987	US 5763284 A	09-06-1998
		FR 2598147 A1	06-11-1987
		AU 7185387 A	05-11-1987
		DE 244295 T1	13-10-1988
		DK 219787 A	31-10-1987
		EP 0244295 A1	04-11-1987
		JP 63039888 A	20-02-1988
		PT 84788 A ,B	01-05-1987
WO 9411019 A	26-05-1994	CN 1110177 A	18-10-1995
		AU 675269 B2	30-01-1997
		AU 5680094 A	08-06-1994
		CA 2127531 A1	26-05-1994
		EP 0634936 A1	25-01-1995
		JP 7503142 T	06-04-1995
		WO 9411019 A1	26-05-1994
		US 6027727 A	22-02-2000
		US 6001599 A	14-12-1999
		US 5989550 A	23-11-1999
		US 5976545 A	02-11-1999
		US 5981228 A	09-11-1999
		US 5837497 A	17-11-1998
US 5831033 A	03-11-1998	US 5721337 A	24-02-1998
		US 6017717 A	25-01-2000
		US 6300479 B1	09-10-2001